
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

LA PNEUMONIE PESTEUSE EXPÉRIMENTALE

PAR M. LE D^r BATZAROFF

MÉDECIN DE L'ARMÉE BULGARE

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Si l'on parcourt l'histoire des épidémies qui ont sévi pendant des siècles, sur différentes parties du vieux monde, et auxquelles on a donné le nom de *peste*, on voit qu'on a signalé les *troubles respiratoires* parmi les symptômes qui accompagnent, très fréquemment, cette maladie. De plus, dans certaines épidémies, et ce sont justement les plus terribles, on trouve les poumons presque exclusivement atteints.

L'épidémie qui a décimé l'Europe et l'Asie sous Marc-Aurèle, celle de 255-265 après Jésus-Christ, dont saint Cyprien nous a donné une fidèle description, la grande peste de Justinien, en 542, et même la terrible *mort noire* ou *peste noire* du xiv^e siècle, qui emporta le quart de la population européenne, doivent être rangées dans cette catégorie.

En effet, dans toutes ces épidémies, les cas à *bubons* étaient relativement rares ou faisaient entièrement défaut, ce qui conduisit certains historiens à croire qu'il s'agissait là d'une maladie différente de la peste (on parlait d'une *fièvre maligne épidémique*), car le bubon était toujours considéré comme le symptôme le plus caractéristique de la peste, et même, jusqu'à ces temps derniers, on affirmait qu'il n'y a pas de peste sans bubon, d'où le nom courant de la maladie : *peste bubonique*.

Sans qu'on puisse l'établir d'une façon certaine, il est probable, cependant, que les grandes épidémies que nous venons de rappeler étaient des épidémies de peste, mais de peste pulmonaire.

En effet, l'existence d'une forme pneumonique de la peste ne pouvait pas échapper longtemps aux bons observateurs. D'abord, on se mit à parler de *complications pulmonaires*, qui se produisent au cours d'une infection pesteuse et qu'on attribuait généralement à des infections secondaires; puis, lors de la petite épidémie de Wetljanka, en 1878-1879, le nom *pneumonie épidémique* est déjà prononcé; mais c'est tout, on ne va pas plus loin; car malgré toutes les présomptions que, dans certains cas, la maladie peut évoluer dans les poumons, la preuve en était à cette époque impossible.

Ce n'est qu'après la découverte de l'agent morbide de la peste, par MM. *Yersin* et *Kitasato*, que cette preuve a pu être donnée.

En décembre 1896, M. *Childe*, professeur d'anatomie pathologique, à Bombay, en se basant sur l'examen bactériologique des crachats pendant la maladie et sur les résultats recueillis à l'autopsie d'un certain nombre de cadavres pestiférés, a démontré l'existence d'une pneumonie pesteuse primaire.

Deux membres de la mission russe, à Bombay, MM. *Wissokowitz* et *Zabolotny*, ont observé, en 1897, plusieurs cas de pneumonie pesteuse et ont pu produire la maladie expérimentalement chez le singe. Depuis ce temps, le fait constaté par Childe a été confirmé par tous ceux qui ont eu occasion d'étudier la peste sur des malades, lors des dernières épidémies en Asie.

A l'heure actuelle, il est établi d'une façon absolue qu'à côté de la peste bubonique, qui n'est que la forme la plus légère de la peste humaine, il existe une *peste sans bubons*, qui évolue sous forme d'une pneumonie. Très fréquente dans certaines épidémies, moins dans d'autres, la pneumonie pesteuse est une des formes les plus redoutables de la peste. Dès lors, il était indiqué de rechercher expérimentalement par quelles voies le virus pesteux pénètre dans l'organisme, quelle est l'évolution de la maladie et quelles sont les mesures à prendre au point de vue de la prophylaxie; c'est le sujet de ce travail.

Chez l'animal comme chez l'homme on retrouve deux formes différentes de pneumonie, à savoir la pneumonie pesteuse primaire et la pneumonie pesteuse secondaire. Occupons-nous d'abord de la première.

Comme nous l'avons dit tout à l'heure, bientôt après la constatation de la pneumonie pesteuse chez l'homme par M. Childe, MM. Wyssokowitz et Zabolotny ont essayé avec succès de reproduire la maladie chez le singe, en introduisant la culture du microbe de la peste dans la trachée de l'animal au moyen d'une sonde pendant l'anesthésie chloroformique. Ce procédé, quoique très ingénieux, est peu commode, surtout quand il s'agit de petits animaux comme les rats et les souris; aussi a-t-on tâché d'en trouver un autre se rapprochant davantage du mode d'infection naturelle.

Si l'on dépose sur la muqueuse nasale d'un animal, et sans l'excorier, un peu de virus pesteux, on lui donne la peste à coup sûr sous forme d'une pneumonie pesteuse¹. Chez le cobaye, — c'est l'animal dont nous nous sommes servi de préférence pour nos expériences, — comme chez le lapin et le singe, cette petite opération se pratique très facilement au moyen d'une baguette fine, préalablement stérilisée, dont une extrémité est garnie d'ouate pour éviter toute blessure. Mais chez les rats et surtout chez les souris, la chose est plus difficile à réaliser, à cause de l'exiguïté des conduits nasaux; aussi se contente-t-on le plus souvent d'enduire les naseaux avec un peu de virus.

Chez ces petits rongeurs, l'infection ne réussit pas à tout coup comme chez les singes, les lapins, les cobayes; mais si l'on opère sur une dizaine de souris, par exemple, il y en aura toujours au moins 5 ou 6 qui prendront la maladie et en mourront.

Le virus, introduit dans les narines, consiste en une petite quantité de bacilles pesteux pris sur une culture en gélose, ou en bacilles puisés dans la rate d'un animal pestiféré. La culture en bouillon ne convient pas pour ce genre d'inoculation, car elle est bientôt rejetée au dehors par l'éternuement et la sécrétion légère qui suit l'introduction du virus.

1. Ce fait a été mentionné dans une note préalable de M. le docteur Roux, en octobre 1898. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 665.)

Lorsque le virus est virulent, la maladie présente toujours une marche régulière. Pendant les 12 premières heures, on constate très souvent un abaissement de la température du corps, qui descend parfois jusqu'à 37° et au-dessous : cela est probablement un effet réflexe causé par l'irritation des nerfs sensibles de la muqueuse. Puis la température remonte lentement et se tient dans les limites normales jusque vers la 30^{me} heure après l'inoculation. Pendant ce temps l'animal mange et continue à se bien porter, de façon que rien dans son état général n'accuse la gravité de la maladie dont il est atteint. L'examen bactériologique seul permet à ce moment un diagnostic précoce ; car une trace du mucus nasal, prélevé du côté inoculé, et examiné au microscope, met en évidence une quantité de microbes pesteux en voie de prolifération rapide, marquée par la petitesse des éléments qui forment cette culture.

Mais bientôt le tableau change : la température monte rapidement à 40,5-41°, dans des cas rares même à 42°, et se maintient à ce degré ; en même temps l'animal devient triste, il cesse de manger, son poil est hérissé, sa respiration accélérée. Cet état maladif va en s'aggravant, le dépérissement est rapide, la respiration devient de plus en plus fréquente et pénible ; elle est en même temps stridente, bruyante : on entend un véritable cornage. L'animal commence à tousser et rejette une petite quantité d'un liquide spumeux, rougeâtre. L'écoulement nasal augmente, la matière qui le constitue forme en se desséchant de petites croûtes jaunâtres autour des naseaux. Par le canal naso-lacrymal l'inflammation de la muqueuse nasale s'étend sur la conjonctive, et la conjonctivite qui s'ensuit frappe d'abord l'œil qui correspond au côté de l'inoculation.

L'état fébrile dure en général 24 à 36 heures, puis la température commence à tomber, et le cobaye meurt à la fin de la troisième ou au commencement de la quatrième journée, après avoir présenté une dyspnée énorme et de l'hypothermie. Si la maladie se prolonge, il se produit très souvent une paralysie musculaire de l'estomac et de l'intestin ; l'abdomen est dans ces cas tendu, bombé, et le déplacement du diaphragme vers la cavité thoracique, à la suite de la dilatation énorme de l'estomac, contribue aussi à la suffocation.

A l'autopsie on trouve les glandes lymphatiques augmentées

de volume, et formant des *bubons secondaires*; de temps à autre on constate cependant l'existence de véritables bubons primaires, constitués d'habitude par les ganglions cervicaux profonds. Une seule fois nous avons observé un bubon axillaire du côté de l'inoculation; la tumeur, qui avait la forme et la grandeur d'une fève, était sanguinolente, d'une consistance molle, et contenait une grande quantité de microbes spécifiques.

Quand on ouvre la cavité thoracique, on remarque que les poumons, qui sont fortement dilatés, ne se rétractent point. Dans un certain nombre de cas ils sont très congestionnés, dans d'autres la congestion est moins forte et c'est alors qu'on distingue le mieux les lésions. Ce sont d'abord de petites hémorragies miliaires de la plèvre viscérale, puis des infarctus pulmonaires plus ou moins étendus, des foyers d'infiltration multiples, qui restent parfois limités et disséminés, séparés par la substance normale du poumon, parfois au contraire les foyers voisins se réunissent les uns avec les autres et finissent par occuper un lobe entier. Dans les cas les plus avancés, on constate de vrais foyers d'hépatisation. Toutes ces lésions pulmonaires sont plus prononcées du côté de l'inoculation que du côté opposé lorsqu'il s'agit d'une inoculation unilatérale.

Les deux poumons sont œdémateux. Quand on coupe les parties malades, il s'écoule un liquide sanguinolent contenant des microbes pesteux tantôt à l'état de pureté, tantôt associés à d'autres microbes étrangers. Dans la cavité pleurale et dans le péricarde on trouve souvent une petite quantité d'un exsudat, ou plutôt un transudat séreux, clair, opalescent ou couleur groseille, dans lequel l'examen microscopique et la culture décèlent la présence du bacille pesteux. Le cœur lui-même est fortement dilaté, surtout le cœur droit. L'épicarde présente parfois de petites hémorragies multiples. Ces hémorragies se retrouvent aussi souvent sur la séreuse péritonéale. La cavité abdominale renferme un peu d'exsudat. La rate est grosse, d'une couleur rouge foncé, de consistance moyenne, sa surface granuleuse est couverte d'un grand nombre de petits points blancs. Cette rate *piquetée*, très caractéristique de la maladie, contient une quantité innombrable de bacilles pesteux. L'estomac est, comme nous l'avons déjà dit, très dilaté; dans les cas où sa tunique musculaire a été paralysée, il présente

des petites hémorragies nombreuses, situées surtout sur la grande courbure. Ces hémorragies, qui intéressent la muqueuse stomacale, apparaissent du côté de la séreuse comme de petites taches rondes, régulières, noirâtres, de la grandeur d'une tête d'épingle, entourées d'un cercle de couleur gris sale. La paralysie s'étend ordinairement au duodénum et à la partie adjacente de l'intestin grêle. Le foie est gros et granuleux, le *ductus cysticus* obturé, la vésicule biliaire fortement dilatée. Les reins et les capsules surrénales sont congestionnés, et souvent parsemés de stries et de points hémorragiques.

Le sang du cœur, prélevé aussitôt après la mort et ensemençé, donne une culture pure du bacille de la peste.

A l'examen microscopique des coupes, on constate une congestion générale du tissu pulmonaire, une tuméfaction de la muqueuse des bronches, qui contiennent un exsudat catarrhal. Il existe de nombreux foyers de broncho-pneumonie; dans ces foyers l'alvéole se présente remplie d'un exsudat composé de cellules des parois alvéolaires desquamées, de leucocytes mononucléaires, de globules rouges et d'un grand nombre de microbes pesteux.

Il résulte de ce court exposé de la marche clinique de la maladie et des lésions, que la *pneumonie qui suit l'introduction du virus pesteux dans le nez d'un animal sensible est tout d'abord une broncho-pneumonie, mais que très vite le virus franchit les poumons, se généralise, et l'animal succombe à une septicémie accompagnée d'un œdème terminal des poumons.*

La mortalité de cette forme de pneumonie chez les animaux est de 100 %.

La pneumonie pesteuse est-elle contagieuse, peut-elle être transmise d'animal à animal par contact ?

Les expériences faites dans ce sens nous permettent de donner une réponse affirmative.

Elles nous ont montré, d'abord, que toutes les sécrétions et excréments de l'animal malade, surtout le liquide qui s'écoule du nez, celui sécrété par la conjonctive lorsqu'elle est atteinte, la matière rejetée par la bouche à la suite des accès de toux qui précèdent la mort, transportées dans le nez d'un animal sain, lui donnent la maladie. Mais cette dernière est aussi transmissible par simple cohabitation. A plusieurs reprises, nous avons mis des

animaux neufs dans les bocalx où se tenaient les animaux inoculés par le nez; dans la majorité des cas ces animaux ont pris la peste, et, à l'autopsie, les lésions pulmonaires et l'absence de tout bubon primaire prouvaient, d'une façon certaine, que c'est bien par les voies respiratoires que l'infection s'était produite. La contagion se fait plus facilement si les animaux sont nourris avec *des carottes ou des betteraves*, parce que les cobayes sains souillent facilement leurs naseaux en rongant les aliments entamés par un animal malade.

La quantité de virus qui suffit pour donner la pneumonie pesteuse à un animal sensible est très petite, et il n'est même pas nécessaire que le virus soit virulent pour que l'infection se fasse.

Dans nos vieilles cultures de différentes provenances, nous en avons choisi une dépourvue de toute virulence. Au cours de cette recherche préliminaire, nous avons bientôt constaté que le microbe pesteux n'est pas toujours semblable à lui-même, qu'en d'autres termes il existe différentes variétés de ce microbe. En général, on peut dire que c'est une erreur de considérer le microbe de la peste humaine comme un être très fragile, car s'il existe incontestablement des races qui s'atténuent très vite et meurent en dehors de l'organisme vivant au bout d'un temps relativement court, il en est d'autres qui, dans les mêmes conditions, gardent longtemps leur vitalité, et persistent sur des milieux artificiels pendant des mois et même des années sans subir aucune atténuation notable. Ainsi nous avons vu que certaines de nos cultures, conservées au laboratoire sans précaution aucune, exposées à la lumière du jour pendant trois mois et demi, tuaient les animaux par injection hypodermique avec un léger retard, et, régénérées deux ou trois fois, se montraient presque aussi virulentes qu'elles l'étaient au début. L'atténuation d'une culture pesteuse n'est donc pas toujours facile à obtenir, elle demande beaucoup de temps et le concours de divers artifices.

En octobre dernier, nous avons reçu trois nouveaux échantillons, qui, tout en étant des cultures pesteuses, authentiques par leur origine et leurs caractères morphologiques, avaient perdu complètement leur virulence : c'étaient de vrais saprophytes pour l'organisme de l'animal, car, inoculées à forte dose à des

souris et à des rats, elles les rendaient à peine malades, et les cobayes n'en souffraient pas du tout.

Nous avons introduit dans le nez d'un cobaye un peu d'une de ces cultures d'origine humaine, poussée sur gélose depuis 24 heures. Le premier passage a été pénible, l'incubation a duré 4 jours, et ce n'est qu'au huitième jour que l'animal a succombé à une pneumonie typique. Avec la rate de ce premier cobaye, nous avons inoculé un second, puis un troisième, un quatrième et ainsi de suite; à chaque passage la durée de la maladie diminuait, la période d'incubation devenait moins longue, de façon que, au bout de plusieurs passages successifs, les animaux mouraient aussi vite que lorsqu'ils étaient inoculés avec notre virus virulent ordinaire.

L'inoculation nasale est donc un excellent moyen pour rendre la virulence à un microbe pesteux, qui, à la suite de l'action nocive de divers agents extérieurs, tels que l'influence du milieu où il séjourne, l'oxygène de l'air, la lumière, etc., est devenu tout à fait inoffensif pour l'organisme de l'animal. Lorsque cette atténuation a été poussée très loin, on réussit encore souvent à obtenir ce retour à la virulence, en ayant soin de combiner l'inoculation nasale avec l'association microbienne; parmi les microbes favorisants, il faut citer en premier lieu le streptocoque.

Mais le fait que nous venons de signaler nous paraît important surtout au point de vue de l'épidémiologie de la peste. En effet, M. *Yersin*, bientôt après sa belle découverte du microbe de la peste, en examinant le sol d'une habitation indigène, a trouvé, à une profondeur de 4-5 centimètres, un microbe semblable à celui de la peste, mais qui n'était pas virulent pour les animaux de laboratoire. C'était probablement un microbe pesteux atténué. Après ce que nous venons de constater pour notre microbe quasi-saprophyte, ne peut-on pas admettre que ce virus atténué, déposé dans le sol des pays à peste endémique, puisse à un moment donné, dans de certaines conditions favorables, pénétrer par les naseaux dans l'organisme d'un animal sensible, tel qu'un rat ou une souris, et, après quelques passages successifs, reprendre toute sa virulence? Ce n'est là certes qu'une hypothèse : elle nous paraît très admissible et mérite d'être examinée de près par tous ceux qui ont occasion d'étudier la peste sur place; à cet égard il serait très intéressant de savoir quelles sont les lésions qu'on

observe chez les animaux morts de la peste spontanée, et s'ils présentent toujours le bubon primaire.

De plus, nous avons pu constater que, même à l'état sec, le virus pesteux reste longtemps vivant et virulent. Pour cela, des organes provenant des animaux morts de peste, ainsi que des cultures pesteuses mélangées avec de la terre d'infusoires, sont soumises à la dessiccation dans le vide à la température de la chambre. De temps à autre, on prélève un peu de la substance desséchée, on broie dans un verre stérilisé, et la poudre ainsi obtenue est introduite en petite quantité dans le nez d'un animal. Les résultats de ces expériences, qui sont indiqués dans le tableau ci-joint, nous montrent que le virus pesteux supporte

PNEUMONIE PESTEUSE PRODUITE PAR INOCULATION NASALE DU VIRUS SEC

PULPE SPLÉNIQUE		CULTURE DESSÉCHÉE SUR TERRE D'INFUSOIRES	
DURÉE DE LA DESSICCATION	DURÉE DE LA MALADIE	DURÉE DE LA DESSICCATION	DURÉE DE LA MALADIE
5 jours.	4 jours 1/2	2 jours	7 jours
8 —	4 — —	5 —	6 — 1/2
12 —	4 — 1/2	7 —	Résiste.
14 —	5 — —	19 —	12 jours
20 —	4 — 1/2	37 —	Résiste.
26 —	4 — 1/2		
30 —	6 — 1/2		
33 —	6 — 1/2		
38 —	6 — 1/2		
44 —	Résiste.		

très bien une dessiccation prolongée, lorsqu'il se trouve dans un milieu albumineux, comme la pulpe de la rate, ou de n'importe quel autre organe; dans ces conditions il ne s'atténue que très lentement, de façon que, dans les premières 3-4 semaines, cette atténuation est insignifiante. Lorsqu'au contraire il n'est pas protégé, comme c'est le cas avec la culture desséchée sur terre d'infusoires, sa virulence baisse rapidement dès les premiers jours, et, au delà de trois semaines, l'inoculation nasale de la culture sèche ne produit plus aucun effet morbide.

En présence de ces faits expérimentaux, il nous semble qu'on a tout le droit d'admettre que les crachats des pestiférés, pneu-

moniques ou autres, les cadavres des animaux morts de la peste, et toute autre substance organique albumineuse renfermant le virus, soit à l'état frais, soit à l'état desséché, jouent un rôle important dans la propagation de la peste humaine en général et de la pneumonie pesteuse en particulier.

La muqueuse nasale n'est pas la seule qui se prête bien à la pénétration du virus pesteux dans l'organisme des animaux. Toutes les muqueuses accessibles jouissent de cette propriété, à un degré plus ou moins considérable. Sans insister davantage sur ce point, très intéressant du reste pour ce qui concerne la pathogénie de la maladie, nous nous bornerons ici à enregistrer le fait, *qu'au point de vue de la facilité de l'infection, les diverses muqueuses peuvent être classées de la façon suivante : muqueuse nasale, conjonctive, muqueuse de la bouche, de l'intestin, du rectum, et en dernier lieu, celle du vagin.* En effet, la maladie provoquée par le dépôt du virus sur la muqueuse vaginale ad'habitude un caractère subaigu : on rencontre même souvent des animaux qui ne prennent pas la maladie par cette voie. Il est fort probable que, dans ces cas, le mucus vaginal ne convenait pas au bacille pesteux : dans le liquide qui s'écoule, on trouve alors quelques microbes de la peste mélangés à beaucoup d'autres espèces.

A chaque muqueuse correspond une forme différente de maladie et une catégorie spéciale de lésions qu'il serait trop long d'énumérer ici. Notons seulement que quand il s'agit d'une peste intestinale¹ contractée à la suite d'injection de substances renfermant des microbes, comme des organes pesteux, par exemple, les ganglions du mésentère, qui représentent les bubons primaires, peuvent atteindre la grosseur d'une noisette. Dans les cas d'infection rectale, on observe de gros bubons inguinaux des deux côtés, et une tuméfaction des ganglions lymphatiques du mésentère; enfin lorsque c'est le vagin qui est le point de départ de l'infection, on trouve en outre toute une chaînette de ganglions tuméfiés qui remonte le long de la colonne vertébrale. Il est évident que l'inoculation de la peste est un excellent procédé pour étudier la distribution et les anastomoses de nombreux

1. Certains auteurs pensent que les animaux ne peuvent pas être infectés par le tube digestif. Nous avons donné la peste aux cobayes en leur faisant manger un petit morceau de rate pesteuse déposée dans leur bouche, de façon que les narines ne puissent être souillées par le virus et que la muqueuse buccale ne soit pas excoriée.

vaisseaux lymphatiques, ainsi que leurs relations avec les ganglions de la région intéressée.

II

La deuxième forme de l'affection pulmonaire dont il est question, la pneumonie pesteuse secondaire, n'est pas une maladie à part comme la première ; c'est une complication qu'on rencontre surtout chez les animaux atteints de la peste bubonique, mais qui peut se développer aussi bien au cours de toute infection pesteuse, indépendamment de la porte d'entrée, à la condition que l'organisme oppose une certaine résistance au microbe envahisseur. Cette résistance est tantôt naturelle, tantôt acquise à la suite d'introduction dans le corps d'une substance vaccinante, telle que des bacilles chauffés ou du sérum antipesteux, en quantité insuffisante pour rendre l'animal tout à fait réfractaire à la maladie, mais suffisante pour stimuler son système de défense dans la lutte qui s'engage entre lui et l'agent morbide, et reculer de cette façon l'issue fatale.

Ce qui caractérise tout particulièrement la pneumonie pesteuse secondaire, c'est la formation dans les poumons, en nombre plus ou moins considérable, de lésions qui présentent à l'œil une telle ressemblance avec les vrais tubercules, qu'en les voyant pour la première fois on pense avoir affaire à une affection tuberculeuse. Ces *pseudo-tubercules*, car nous allons voir tout à l'heure qu'en dehors de leur forme extérieure ils n'ont rien de commun avec les véritables tubercules, ont leur siège de préférence dans la partie superficielle du poumon. Au début de leur formation, on voit apparaître sous la plèvre viscérale de petits points blanchâtres plus ou moins espacés, entourés d'une zone de réaction rouge foncé, et qui augmentent de plus en plus de volume. Les pseudo-tubercules déjà formés se présentent sous la forme de corps ronds ou un peu allongés, blancs ou de couleur gris sale, dont la surface convexe, proéminente au-dessus du niveau de la plèvre, donne au poumon un aspect granuleux.

Ces formations sont tantôt très nombreuses, parsemées sur toute la surface pulmonaire, et alors elles sont petites comme des grains de mil ou des lentilles, tantôt leur nombre est restreint, mais en revanche elles peuvent atteindre la grandeur d'un petit pois. Dans des cas tout à fait exceptionnels, nous avons observé

de véritables tumeurs grosses comme des noisettes. En outre, il arrive parfois que, par confluence de plusieurs tubercules voisins, toute une partie du poulmon subit une transformation en un tissu compact complètement dépourvu d'air, tombant aussitôt au fond de l'eau : on dirait un poulmon en état d'hépatisation grise. Au toucher, les pseudo-tubercules donnent la sensation de corps durs. Lorsqu'on coupe en deux un de ces corps, et qu'on l'exprime entre les branches d'une pince, il s'écoule de la surface coupée un liquide trouble, grisâtre, contenant, à côté d'une quantité innombrable de microbes pesteux, un certain nombre de cellules, dont la plupart sont de gros leucocytes mononucléés.

Les poulmons porteurs de pseudo-tubercules sont en général volumineux et fortement congestionnés. Sur les coupes microscopiques, colorées à la thionine, on constate que les capillaires sont très dilatés et gorgés de sang, mais que la réaction périvasculaire fait défaut. De petites hémorragies imbibent en différents points la substance pulmonaire. La structure du poulmon est dans son ensemble profondément altérée, à tel point que dans certains endroits il est impossible de la reconnaître. Là où elle est encore reconnaissable, on remarque un épaississement énorme des cloisons qui limitent les parois des alvéoles et les lobules pulmonaires, dû à une infiltration leucocytaire très forte. Entre les leucocytes, on voit une grande quantité de microbes pesteux ; parfois, mais rarement, on en trouve aussi à l'intérieur même des leucocytes. Les éléments qui composent cette infiltration sont au début encore assez bien conservés ; dans un stade plus avancé des lésions, ces éléments sont détruits et alors on ne voit que de larges traînées d'une masse amorphe, composée de détritits cellulaires. La plupart des alvéoles, également dilatées, sont remplies d'un exsudat formé par des cellules de desquamation des parois des alvéoles, par des leucocytes et des globules rouges ; au milieu de ces éléments, on voit les microbes en quantité plus ou moins grande. Les éléments qui prennent part à la formation de ces exsudats sont dans certains endroits relativement bien conservés, dans d'autres ils sont profondément altérés et en voie de destruction. Alors l'alvéole se présente remplie d'une substance granuleuse, amorphe, parsemée par-ci par-là de petits amas d'une masse chromatique, —

— résidus des noyaux détruits — de quelques éléments cellulaires qu'on peut encore reconnaître malgré l'altération, soit de leur protoplasma, soit de leur noyau, et d'une grande quantité de microbes : ce sont là de véritables foyers de nécrose.

A l'endroit correspondant aux pseudo-tubercules, dont nous avons donné plus haut la description microscopique, la structure pulmonaire est méconnaissable. Situés à la périphérie du poumon sous la plèvre, ces tubercules sont formés d'une agglomération énorme de cellules rondes, surtout de leucocytes mononucléés, dont la plupart présentent des altérations très grandes du protoplasma et du noyau, de quelques résidus du stroma du tissu conjonctif, et d'une véritable culture du microbe de la peste ; le tout est entouré d'une zone de réaction vasculaire très forte, et de petites hémorragies disséminées à la périphérie des pseudo-tubercules.

D'après ce tableau microscopique, on voit que les principaux éléments qui entrent dans la formation d'un tubercule ordinaire, à savoir : la cellule géante et les cellules épithélioïdes, manquent complètement dans ces foyers d'infiltration.

Comme forme pathologique, la pneumonie pesteuse expérimentale secondaire ne ressemble point aux autres formes de pneumonie qu'on est habitué à rencontrer. C'est une pneumonie à part dont nous ferons l'anatomie microscopique dans un travail ultérieur. Ce qu'on peut affirmer dès maintenant avec certitude, c'est que cette pneumonie n'est pas d'origine embolique, mais que c'est le réseau lymphatique du poumon qui en est le point de départ.

La pneumonie pesteuse secondaire, telle que nous venons de la décrire, témoigne d'une résistance de l'organisme de l'animal vis-à-vis du virus, et les pseudo-tubercules sont le résultat d'une défense insuffisante.

Pour la provoquer expérimentalement on a deux moyens à sa disposition : 1^o employer un virus atténué ; 2^o introduire préalablement dans le corps de l'animal et en petite quantité une substance vaccinante.

En effet, lorsque le virus est très actif et que la mort survient dans les 3-4 premiers jours, les poumons ne présentent qu'une simple congestion ; les lésions principales portent sur la rate qui est grosse et couverte de petits points blancs. Si au

contraire on se sert d'un virus qui ne tue l'animal qu'en 7-9 jours, on peut obtenir souvent — ce n'est pas la règle — la formation de pseudo-tubercules typiques dans les poumons; mais dans ces cas-là, les lésions des autres organes subsistent aussi, elles ne sont que plus prononcées. Ainsi les petits points blancs de la rate se sont transformés en petits abcès miliaires, on observe même des abcès pareils à la surface du foie et des reins.

Beaucoup plus sûr et plus commode à manier est le second procédé, c'est-à-dire l'injection d'une substance vaccinante. En faisant l'expérience sur une série d'animaux, et en employant des doses de plus en plus fortes de la matière préservatrice, on réussit facilement à obtenir toute une gamme de lésions, et alors on constate ce fait singulier, qu'au fur et à mesure que les lésions des autres organes diminuent avec l'immunité croissante, celles des poumons augmentent, de sorte qu'à un moment donné, lorsque l'animal se trouve près du point de l'immunité absolue, les lésions pulmonaires sont les seules lésions internes qu'on rencontre à l'autopsie : tous les autres organes, notamment la rate et le foie, gardent leur apparence normale, et le virus pesteux n'existe que dans le poumon et dans les pseudo-tubercules.

La propriété de produire une pneumonie à pseudo-tubercules chez le cobaye, dans les conditions que nous venons d'indiquer, n'appartient pas exclusivement au microbe de la peste. Les mêmes lésions ont été signalées dans certaines maladies septicémiques, entre autres dans celle due au microbe du Hog-Choléra par MM. *Schweinitz*¹ et *Théobald Smith*². C'est un fait de plus qui plaide en faveur de la parenté déjà si frappante de la peste avec les autres septicémies hémorragiques.

Mais les expériences relatées ci-dessus présentent à notre avis un intérêt plus général, notamment au point de vue de l'immunité. Il semble en effet, d'après ces expériences, que chaque organe a son immunité à lui, et que l'immunité générale ou absolue n'est acquise que lorsque tous les organes du corps sont immunisés. A cet égard les différents organes ne se comportent pas de la même façon, car il résulte de nos expériences que la rate et

1. *Medical News*, October 4, 1890.

2. Additional investigations concerning infections swine diseases, *U. S. department of agriculture*, Bulletin n° 6, 1894.

le foie, par exemple, sont les premiers vaccinés contre la peste, tandis que le poumon ne vient qu'en dernier lieu. Quelle est la cause de cette infériorité du poumon ? S'agit-il d'une question d'aération qui facilite la culture du microbe ? Est-elle due à la pauvreté de cet organe en éléments phagocytaires, ou y a-t-il plusieurs facteurs en jeu ? Il est évident que ce sont des questions qui nécessitent pour être résolues des études spéciales et approfondies. Contentons-nous donc pour le moment de signaler le fait, sans chercher à en tirer de conclusions.

III

Après avoir reproduit chez le cobaye les deux formes de la pneumonie pesteuse, nous avons essayé aussi la prévention et le traitement de la pneumonie pesteuse primaire chez cet animal au moyen du sérum antipesteux ; mais avant de rapporter les résultats de ces expériences, il nous semble utile de dire quelques mots sur la préparation même du sérum.

La sérothérapie de la peste a été inaugurée, en 1895, lorsque, sous la direction de M. Roux, MM. Yersin, Calmette et Borrel ont entrepris l'immunisation des petits animaux de laboratoire en leur injectant d'abord des microbes tués par la chaleur, puis des microbes vivants. Un cheval qui avait reçu des injections ménagées de cultures pesteuses vivantes et virulentes fournit un sérum qui immunisait les souris qui en recevaient 1/10 de cent. cube, 12 heures avant l'injection ; à la dose de 1,5 c. c. il guérissait les souris inoculées 12 heures auparavant au moyen d'un fil de platine chargé de virus pesteux. Ce premier sérum appliqué par M. Yersin, en 1896, au traitement d'un certain nombre de cas de peste bubonique à Canton et Amoy, a donné des résultats excellents.

Malgré son efficacité, cette méthode de préparation du sérum antipesteux par virus vivant présente des dangers. Aussi a-t-on essayé d'immuniser les gros animaux d'une façon moins dangereuse, en leur injectant soit des cultures pesteuses tuées, soit des substances extraites du corps des microbes ; ces méthodes ne fournissent pas un sérum aussi actif.

En partant de l'idée que le sérum curatif contre la peste doit être un sérum essentiellement antitoxique, on a voulu imiter le procédé courant pour la préparation des sérums antidiphthérique

et antitétanique, en employant pour l'immunisation des animaux non plus les corps microbiens, mais les produits solubles élaborés par le microbe lorsqu'il est cultivé dans des milieux liquides; or les tentatives faites dans cette direction n'ont pas abouti à un résultat satisfaisant, peut-être parce que jusqu'à présent on n'a pas réussi à préparer en dehors de l'organisme une toxine suffisamment fortée.

C'est M. Roux qui a démontré le premier l'existence de produits toxiques solubles dans le milieu liquide qui sert à la culture du microbe de la peste. En se servant d'un virus, dont la virulence était très exaltée par des passages successifs, faits au moyen de petits sacs en collodion introduits dans le péritoine de l'animal, M. Roux a pu obtenir des toxines qui tuaient la souris à la dose de 1/70 c. c. et au delà en moins de 12 heures; mais ces mêmes toxines se montraient peu actives pour les lapins et surtout pour les cobayes. Dans ces temps derniers, M. Markl prétend avoir préparé une toxine active pour la souris à la dose de 1/200 c. c., et qui tue le cobaye en 8 jours à la dose de 0,5 — 5 c. c., sans donner toutefois assez de détails sur le procédé dont il s'est servi pour qu'on puisse reproduire ses expériences; mais M. Markl, lui aussi, a constaté le fait que, même avec une toxine aussi forte que la sienne, on ne peut pas donner aux animaux une immunité active, absolue et durable contre l'inoculation virulente, et qu'on ne peut pas non plus obtenir avec elle un sérum qui réponde à toutes les exigences. En présence de ces faits, il y a lieu de se demander si la toxine qu'on trouve dans le bouillon de culture est le vrai poison pesteux, c'est-à-dire le même que celui que le microbe sécrète dans l'organisme vivant. Ce qui est sûr, c'est que cette toxine ne se forme qu'à basse température, et qu'une fois formée elle est peu stable, car elle se détruit rapidement sous l'influence de la chaleur, de l'oxygène, de l'air et de la lumière.

La méthode combinée, sur laquelle compte M. Markl pour avoir un bon sérum antipesteux, et qui consiste dans l'emploi simultané, pour l'immunisation des animaux, et des corps microbiens et de la toxine soluble, n'est pas nouvelle; elle a été essayée à l'Institut Pasteur il y a longtemps, mais on a pu constater que pour la qualité du sérum elle ne présente aucun avantage.

L'immunisation avec des bacilles vivants et virulents est

incontestablement celle qui a donné jusqu'à présent les meilleurs résultats. Elle doit être poursuivie pendant longtemps et appliquée avec prudence; car si l'on va brusquement on risque de perdre les animaux; de plus tous les chevaux immunisés dans les mêmes conditions ne donnent pas un bon sérum, il faut donc opérer toujours sur plusieurs animaux pour pouvoir choisir les meilleurs. Le sérum ainsi obtenu est, comme l'a démontré M. Roux, à la fois anti-infectieux et antitoxique. 1/20 c. c. de ce sérum préserve la souris contre un virus qui tue en 3 jours, et 1/4 c. c. la guérit, lorsqu'il est injecté 12 heures après l'inoculation virulente. Si l'on se sert d'un virus qui tue en 36 heures, les doses de sérum nécessaires pour préserver et pour guérir la souris sont de 1/10 c. c. et 1/2 c. c.

Le cobaye est un animal très sensible à la peste, et il est difficile de le rendre réfractaire à cette maladie; c'est un fait reconnu par tous les expérimentateurs. Néanmoins avec un bon sérum on immunise cet animal contre la maladie, et on arrête celle-ci lorsqu'elle est déjà déclarée. Ainsi 1 c. c. de sérum, mélangé avec une dose sûrement mortelle d'une culture pesteuse, rend cette dernière tout à fait inoffensive pour le cobaye. Le cobaye, qui a reçu 1—2 c. c. de sérum 12 heures avant l'inoculation virulente, ne contracte pas la maladie; de même on peut guérir un cobaye de la peste si on lui injecte 3—5 c. c. de sérum 24 heures après l'inoculation sous-cutanée du virus. Enfin 3 c. c. de sérum, injectés sous la peau d'un cobaye, le protègent contre l'inoculation intra-péritonéale d'une dose de virus pesteux, qui tue le témoin en 48 heures. Toutes ces expériences ont été faites sur des animaux de 500-700 grammes.

C'est avec ce sérum que nous avons essayé la sérothérapie de la pneumonie pesteuse primaire du cobaye. Les nombreuses expériences faites dans ce but ont montré que 1 c. c. de sérum, injecté 12 heures avant l'infection nasale, suffit pour préserver l'animal lorsque le virus est pris sur une culture en gélose, mais si l'on se sert pour l'inoculation de la pulpe splénique d'un animal pestiféré, la dose de sérum nécessaire pour prévenir la maladie est au minimum 2 c. c.

Les essais pour guérir la pneumonie pesteuse au moyen du sérum antipesteux ont donné des résultats moins favorables, comme cela est indiqué dans le tableau suivant :

INOCULATION NASALE AVEC LA PULPE SPLÉNIQUE		
QUANTITÉ DU SÉRUM INJECTÉ	MOMENT DE L'INTERVENTION	ISSUE DE LA MALADIE
3 c.c.	Aussitôt après l'inoculation.	Guérison.
3 c.c.	1 h. 1/2 — —	Mort en 11 jours 1/2.
3 c.c.	4 heures — —	— 6 jours 1/2.
5 c.c.	7 heures — —	— 9 jours 1/2.
5 c.c.	15 heures — —	— 8 jours 1/2.
5 c.c.	24 heures — —	— 7 jours 1/2.
5 c.c.	40 heures — —	— 5 jours.
Témoin.	— — — —	— 4 jours 1/2.

Ce tableau est très instructif. Il nous montre d'abord qu'avec 3 c. c. de sérum, injectés au moment de l'inoculation, on peut très bien empêcher le développement de la pneumonie, mais que déjà une heure 1/2 plus tard cette même quantité de sérum ne sert qu'à prolonger la maladie. Si l'on veut obtenir cet effet 7 heures après l'inoculation, il faut une quantité de sérum beaucoup plus considérable, et enfin il arrive un moment où, malgré l'injection du sérum, les animaux meurent presque en même temps que les témoins.

Il est donc beaucoup plus facile de prévenir la pneumonie pesteuse primaire avec le sérum antipesteux, que de la guérir, et cela s'explique très bien, si l'on se rappelle ce que nous avons dit à propos de la pneumonie pesteuse secondaire, à savoir que, dans le poumon, le microbe de la peste trouve des conditions extrêmement favorables à son développement, et que là il est très peu accessible aux cellules protectrices de l'organisme. Il faut cependant remarquer que, chez beaucoup d'animaux morts malgré l'injection du sérum, on trouve à l'autopsie non pas le microbe de la peste, mais d'autres microbes étrangers; ces animaux ont succombé, par conséquent, à des affections secondaires, dont le terrain a été préparé par l'infection pesteuse primaire.

Le tableau, dont nous venons de parler, amène quelques réflexions d'ordre général. En effet on voit bien qu'il ne suffit pas d'avoir un bon sérum, mais il faut encore savoir s'en servir,

c'est-à-dire l'employer au bon moment. Ceci est surtout important lorsqu'on a affaire à une maladie septicémique, comme la peste, où il faut compter avec la multiplication rapide et énorme du microbe. C'est un fait bien établi à présent que le sérum n'agit pas par lui-même — le bacille pousse bien dans le sérum spécifique — mais par l'intermédiaire de certaines cellules de l'organisme, dont il excite l'action; or le nombre de ces cellules est toujours restreint, tandis que celui du microbe, qui se multiplie selon les règles de la progression géométrique, augmente dans des proportions fantastiques, de sorte qu'à partir d'un certain moment toute intervention devient illusoire. Dans la pratique on ne tient pas généralement compte de ce fait, et on exige souvent du sérum ce qu'il ne peut pas donner.

Pour ce qui concerne spécialement la peste, il faudrait toujours porter son attention sur la forme de la maladie et le temps qui s'est écoulé depuis le moment de l'infection jusqu'à l'application du sérum. La pneumonie pesteuse primaire, par exemple, est une forme de la peste qui sera difficile à guérir avec le sérum antipesteux : c'est ce qui ressort de nos expériences.

CONCLUSIONS

I. L'animal peut contracter les deux formes de la pneumonie pesteuse qu'on observe chez l'homme, à savoir la pneumonie pesteuse primaire et la pneumonie pesteuse secondaire.

II. La pneumonie pesteuse expérimentale primaire est une broncho-pneumonie lobulaire ou confluente, qui aboutit généralement à une septicémie. On peut la provoquer chez tous les animaux de laboratoire, en déposant sur leur muqueuse nasale et sans l'excorier, un peu de virus pesteux pris sur une culture en gélose, ou mieux encore, dans la rate d'un animal pestiféré.

III. La pneumonie pesteuse est transmissible d'animal à animal par contact. Les sécrétions de l'animal malade, notamment les larmes, le mucus nasal et bronchique, transportées dans le nez d'un animal sain, lui confèrent la maladie.

IV. Un virus pesteux, qui ne tue plus par inoculation hypodermique, donne la pneumonie à l'animal lorsqu'il est introduit dans ses voies respiratoires; après plusieurs passages successifs par le nez, ce virus atténué finit par reprendre sa virulence.

V. Le virus pesteux desséché avec des matières albumineuses

est capable de provoquer chez l'animal, par inoculation nasale, une pneumonie pesteuse, même après plusieurs semaines de dessiccation.

VI. La pneumonie pesteuse secondaire se développe chez le cobaye au cours de toute infection pesteuse, indépendamment de la porte d'entrée, à la suite d'une résistance naturelle ou acquise de l'animal vis-à-vis du virus. Comme forme anatomique, c'est une pneumonie particulière qui conduit à la formation de pseudo-tubercules à la surface du poumon.

VII. Avec le sérum antipesteux, on peut très bien prévenir la pneumonie pesteuse primaire de l'animal, mais il est difficile de la guérir lorsqu'elle est déclarée.

VIII. Toutes les muqueuses accessibles de l'animal se prêtent, plus ou moins bien, à la pénétration du virus pesteux. Selon le degré de leur sensibilité, on peut les classer de la façon suivante : muqueuse nasale, conjonctive, muqueuse de la bouche, de l'intestin, du rectum et en dernier lieu la muqueuse du vagin.

Envoyé par le Gouvernement Bulgare pour étudier la peste et la préparation du sérum antipesteux, j'ai trouvé la plus large hospitalité à l'Institut Pasteur, où tous les moyens de travail ont été mis à ma disposition. C'est pour moi un devoir des plus agréables d'exprimer ici ma reconnaissance aux chefs de cet Institut, MM. Duclaux, Metchnikoff et Roux, et surtout à ce dernier.

BIBLIOGRAPHIE

1. NETTER. La Peste et son microbe. *La Semaine médicale*, 1895, n° 9.
2. YERSIN. La Peste bubonique à Hong-Kong. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1894, p. 662.
3. YERSIN, CALMETTE ET BORREL. La Peste bubonique. Deuxième note. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1895, p. 589.
4. ROUX. Sur la Peste bubonique et son traitement par le sérum anti-pesteux. *La Semaine médicale*, 1897, p. 27.
5. YERSIN. Sur la Peste bubonique. Sérothérapie. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1897, p. 81.
6. DE GIAXA E GOSIO. Recherche sul bacillo della peste bubbonica in rapporto alla profilassi. *Ref. Centralbl. f. Bacteriol.*, 1897, n° 13.

7. GABRITSCHESKY. Zur Biologie des Pestbacillus. *Russ. Arch. f. path.-Klin. Med. u. Bacteriol.*, 1897, Bd. III, n° 4.
 8. CHILDE. Remarks on the occurrence of plague pneumonia. *British med. Journal*, 1897, p. 1213.
 9. METCHNIKOFF. Sur la Peste bubonique. Communication au Congrès de Moscou. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1897, p. 736.
 10. ZABOLOTNY ET WYSSOKOWITZ. Recherches sur la Peste bubonique. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1897, p. 663.
 11. STICKER. Ueber die Pest nach Erfahrungen in Bombay. *Münch. med. Wochenschr.*, 1898, n° 1.
 12. GABRITSCHESKY. Ueber die Gewinnung des Pestserums. *Russ. Arch. f. path.-klin. Med. u. Bacteriol.*, 1897.
 13. WERNICKE. Ueber Immunisirungsversuche bei der Bubonenpest. *Ref. Centralbl. f. Bacteriol.*, 1898, n° 22.
 14. WLADIMIROFF. Zur Technik der Pestserumbereitung. *Wratsch*, 1897, n° 46.
 15. DIEUDONNÉ. Ueber die Resultate der Yersin'schen und Haffkine'schen Immunisirungs und Heilungsversuche bei Pest. *Münch. med. Wochenschr.*, 1898, n° 6.
 16. Mittheilungen der deutschen Pestkommission in Bombay. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, nos 17, 19, 31, 32.
 17. LUSTIG UND GALEOTTI. Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Thieren. — Schutzimpfungen gegen Beulenpest. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, nos 15, 19.
 17. KOLLE. Zur Bakteriologie der Beulenpest. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, n° 40.
 18. ABEL. Zur Kenntniss des Pestbacillus. *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1897, n° 13.
 19. WILM. Ueber die Pestepidemie in Hong-Kong im Jahre 1896. *Hyg. Rundschau*, 1897, nos 5, 6.
 20. GLADIN. Die Lebensfähigkeit der Pestbacillen unter verschiedenen physikalischen Bedingungen. *Ref. Centralbl. f. Bakteriol.*, 1898, n° 15.
 21. BANDI UND STAGNITTA BALESTIERI. Die Verbreitung der Bubonenpest durch den Verdauungsweg. *Zeitsch. f. Hyg.*, 1898. Bd. XXVIII, p. 26.
 22. MARKL. Beitrag zur Kenntniss der Pesttoxine. *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1898, nos 18, 20.
 23. SIMOND. La propagation de la Peste. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1898, n° 40.
 24. HANKIN. La propagation de la Peste. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1898, n° 41.
 25. Ueber die Beulenpest in Bombay im Jahre 1897. *Gesamtbericht der Akad. d. Wissensch. in Wien Kommission*. Wien, 1898.
-

ÉTUDES SUR L'IMMUNISATION CONTRE LE SÉRUM D'ANGUILLES

PAR M. LE D^r TH. TCHISTOVITCH

(Travail des laboratoires de MM. Metchnikoff et Roux.)

La question de l'immunité active contre les microbes peut être considérée pour le moment comme résolue par la théorie de la phagocytose. Il y a un autre problème beaucoup plus difficile et plus compliqué, c'est celui de l'immunité contre les toxines. Depuis deux ou trois ans seulement, les travaux de Metchnikoff et ses élèves, de Ehrlich et Wassermann, en ont commencé l'étude.

En 1897, M. Ehrlich ¹ démontra qu'on peut *in vitro* paralyser l'action coagulante de la ricine sur le sang de lapin en la mélangeant avec le sérum antitoxique de chèvre immunisée contre la ricine. Cette expérience était autant plus précieuse qu'elle prouva pour la première fois qu'il est possible d'étudier l'immunité contre les toxines en dehors de l'organisme.

M. H. Kossel ² publia bientôt un fait analogue et encore plus intéressant, concernant une autre substance toxique : le sérum d'anguille, qui dissout *in vitro* très facilement les hématies de lapin, peut être rendu tout à fait inoffensif, si on lui ajoute du sérum antitoxique. Cependant, à côté de cela, M. Kossel observa que les globules rouges des lapins immunisés contre le sérum d'anguille ne se dissolvaient plus, et cette résistance croissait avec le degré d'immunisation de l'animal. Cette dernière découverte de Kossel a été confirmée dans ces derniers temps par MM. Camus et Gley ³. Nous avons essayé d'ajouter quelques faits aux travaux de nos devanciers sur ce point.

1. Zur Kenntniss der Antitoxinwirkung. *Fortschritte d. Medicin*, n° 2, 1897.

2. Zur Kenntniss der Antitoxinwirkung. *Berliner Klin. Woch.*, n° 7, 1898.

3. Recherches sur l'action physiologique du sérum d'anguille. Contribution à l'étude de l'immunité naturelle et acquise. *Arch. internat. de pharmacodynamie*, V, t. III et IV, 1898.

De tous les animaux de laboratoire, les lapins sont les plus aptes à l'immunisation : ils la supportent très facilement et donnent une antitoxine assez forte après un laps de temps très court. C'est pourquoi nous nous en sommes servi principalement. Nous les avons immunisés en leur injectant des doses croissantes de sérum d'anguille frais dans les veines ou sous la peau, en partant de 0,05-0,1 c. c. ; si le lapin supportait bien cette première injection et reprenait son poids primitif, il supportait ordinairement très bien les suivantes.

Il est plus difficile d'immuniser les cobayes. Nous avons perdu beaucoup d'animaux et n'en avons conservé que deux suffisamment immunisés ; mais la quantité de sérum qu'ils purent nous fournir était insuffisante pour nos expériences.

Les chiens supportent bien les injections de sérum d'anguille et donnent de l'antitoxine, mais pas assez forte.

Une chèvre, qui n'avait reçu que 3,15 c. c. de sérum d'anguille sous la peau, a donné une excellente antitoxine, plus forte que beaucoup d'autres provenant de lapins et de chiens. Malheureusement l'immunisation de cette chèvre a été entreprise trop tard et nous n'avons pas pu employer son antitoxine dans nos recherches.

Les poules, qui sont insensibles au sérum d'anguille, ne donnent pas de véritable antitoxine après des injections répétées dans le péritoine ; cependant il paraît que le sérum des poules ainsi traitées peut à fortes doses empêcher *in vitro* la dissolution des globules rouges du lapin ¹.

Les pigeons meurent très facilement d'une injection de 0,1 c. c. de sérum d'anguille dans le péritoine, quoique leurs globules rouges soient presque insolubles ; après des injections répétées de petites doses croissantes sous la peau, le sang des pigeons acquiert des propriétés antitoxiques très faibles (contre la dissolution des globules de lapin *in vitro*).

Après ces courtes observations préalables, occupons-nous de l'antitoxine des lapins.

Il suffit d'injecter 2 à 4 fois de petites doses de sérum d'anguille pour provoquer dans le sang des lapins des propriétés antitoxiques. Ordinairement la force de cette antitoxine n'est

1. Ces expériences ont été faites avec le sérum chauffé à 55°, comme toutes les fois qu'il s'agissait d'étudier l'action antidissolvante d'un sérum d'une autre espèce animale.

pas grande, et pour neutraliser la toxicité d'une partie de sérum d'anguille, il en faut 10-15-20 parties (la chèvre fournit une antitoxine d'une valeur de 10 pour 1). Le résultat obtenu sur un grand nombre de lapins soumis à l'immunisation était toujours le même, l'antitoxine apparaissait régulièrement et avait à peu près la même valeur.

Nous employions pour l'examen de l'antitoxicité les deux procédés suivants : dans de petits tubes à essai nous mettions 5 gouttes d'une solution de 10 0/0 de sérum d'anguille dans de l'eau physiologique, ce qui équivaut à 1/2 goutte de sérum entier, et des quantités croissantes d'antitoxine, à partir de 3 gouttes ; puis nous ajoutions dans chaque tube 1 ou 2 c. c. de sang de lapin (normal) dilué au 20^e avec une solution de chlorure de sodium à 7^o/₁₀₀. Le tube contenant la quantité minimum d'antitoxine et ne présentant aucune diffusion de l'hémoglobine dans le liquide nous indiquait la valeur antitoxique du sérum éprouvé (contre l'action dissolvante sur le sang de lapin).

D'un autre côté, nous injectons dans les veines, à plusieurs lapins, de fortes doses de toxine mélangée avec diverses quantités de la même antitoxine. Les deux résultats concordaient ordinairement plus ou moins, ou bien différaient un peu.

Voulant augmenter la propriété antitoxique, nous nous sommes mis à injecter à une série de lapins des doses croissantes dans les veines ou sous la peau, et nous avons réussi à leur faire supporter des quantités de toxine plusieurs fois mortelles. En éprouvant de temps en temps l'antitoxine de ces lapins, nous avons constaté un fait très inattendu : l'antitoxicité baissait progressivement au cours de l'immunisation, malgré que les doses injectées augmentaient : les conditions dans lesquelles on prélevait le sang restaient toujours les mêmes, et le poids des lapins indiquait leur état de santé et de vigueur complète. Dans toutes nos expériences il n'y a pas eu une seule exception sur ce point ¹ : l'antitoxine, plus ou moins forte dès le début de l'immunisation, s'affaiblissait au fur et à mesure qu'on poussait celle-ci plus avant, et chez les lapins qui avaient reçu les quantités maxima de toxine et qui supportaient très bien des doses

1. Le seul cas qu'on nous pourrait objecter et le lapin XI, qui, à la dernière prise de sang, faite à cause de sa mort imminente, nous fournit une augmentation de valeur de son antitoxine, surtout *in vitro*.

dépassant de beaucoup la dose mortelle en quelques minutes, l'antitoxine descendait jusqu'à un niveau si bas qu'elle pouvait à peine être démontrée par l'expérience. Pour en donner des exemples, il suffit d'un côté de citer les expériences avec les lapins XI, XII, XVII et XVIII, où cet abaissement d'antitoxicité pendant le cours de l'immunisation a été observé directement, et de l'autre de comparer les chiffres de la valeur des sérums obtenus après une immunisation forte et prolongée (lapins IV, XIII et XIV) avec ceux qui correspondent à l'immunisation à peine commencée (lapins II, V, VI, VII, VIII, IX).

La présence dans le sang des lapins d'une antitoxine plus ou moins forte ne peut donc pas servir de critérium du degré de leur immunisation contre le sérum d'anguille. Il est évident que la réaction initiale de l'organisme à l'introduction de la toxine cède dans ce cas la place à un autre mécanisme; celui-ci détruit la toxine aussi bien, ou même avec plus de perfection, mais il n'est pas accompagné par la production de l'antitoxine.

Admettons pour un instant que la destruction de la toxine se produise par une digestion intracellulaire, ressemblant à la digestion de l'albumine par le suc pancréatique: au commencement elle n'est pas parfaite et aboutit à la formation d'antitoxine, comme l'albumine aboutit à l'albumose dans le cas de la trypsine; alors l'antitoxine est rejetée dans le sang. Mais au fur et à mesure que les cellules s'habituent à cette digestion un peu nouvelle et se perfectionnent dans leur besogne, la destruction va plus loin, jusqu'à la peptone dans notre exemple, ou bien elle amène la décomposition complète de la toxine.

Cette interprétation des faits observés est encore bien loin de la certitude, mais s'appuie néanmoins sur quelques observations.

Nous avons vu plus haut la preuve faite par M. Kossel, que les globules rouges des lapins immunisés contre le sérum d'anguille deviennent moins solubles dans ce sérum, et cela à un degré qui correspond au degré d'immunisation. Ce fait a été confirmé par Camus et Gley sans réserve. Nous nous sommes occupés de la même question avec cette seule différence, qu'en même temps que nous établissions la solubilité des hématies d'un lapin immunisé, nous éprouvions le degré d'antitoxicité de son sérum. Sur 50 c. c. de sang prélevé dans une artère, nous en

défibrinions une partie (10 c. c.); le reste servait à préparer le sérum après coagulation. Le sang défibriné était soumis à la centrifugation pour séparer les globules du sérum; nous enlevions ce dernier, et pour éloigner les derniers restes de l'antitoxine, nous délayions de nouveau les globules dans du sérum normal, après quoi le mélange était centrifugé encore une fois. Par ce procédé nous obtenions les globules débarrassés de sérum antitoxique. Ayant fait avec ces globules un mélange au 20^e dans une solution à 7 0/00 de NaCl (cette solution est fortement hyperisotonique), nous le répartissions dans une série de tubes par volumes de 1 c. c., auxquels nous ajoutions différentes quantités de sérum d'anguille; comme témoin nous nous servions du sang d'un lapin normal, prélevé et traité chaque fois dans les mêmes conditions. D'un autre côté nous avons toujours établi la valeur antitoxique correspondante par les procédés déjà décrits.

Nous avons fait ainsi 17 épreuves de solubilité, dans le sérum d'anguille, des globules rouges de lapins immunisés: 9 nous ont présenté une augmentation de résistance plus ou moins grande, comme on peut le voir dans la table (cas IV, VII', VIII', IX'', XI'', XII, XII'', XIV, XVIII, XVIII' et XVIII''). Par contre, les autres 8 expériences (plutôt 7, parce que dans le cas X les doses de toxine ont été trop fortes) ne présentèrent aucune augmentation de résistance (cas VIII, X, XI, XI', XIII, XIII', XVII, XVII').

En analysant de plus près ces expériences, nous remarquons d'abord que cette augmentation de résistance apparaît souvent au moment où l'immunisation est déjà poussée jusqu'à un degré plus ou moins élevé (VII', VIII' et XI'). Ensuite il devient évident que la diminution de solubilité n'est pas en relation avec la quantité de l'antitoxine dans le sang; d'ailleurs, l'antitoxine dissoute ne pouvait jouer aucun rôle dans la résistance des hématies, parce qu'elles étaient soigneusement lavées; et si nous examinons attentivement la table, nous verrons que l'augmentation de résistance s'observait justement dans les cas où l'antitoxine était plus faible, où il y en avait moins (XII, surtout XII'', XVIII' et XVIII''); par contre, dans les cas X, XI, et surtout VIII, l'antitoxine était très forte, tandis que la solubilité des globules rouges, non seulement n'était pas inférieure à la normale, mais la dépassait même dans le cas VIII.

Ainsi nous pouvons considérer les observations de M. Kossel en général comme tout à fait justes : il se passe pendant l'immunisation contre le sérum d'anguille certaines modifications dans les globules rouges, qui ont pour conséquence un surcroît de stabilité ; cependant il faut ajouter que les modifications dont il est question ne sont nullement parallèles à l'antitoxicité du sang ; loin de là, elles la remplacent au moment où l'antitoxicité au cours de l'immunisation baisse en cédant la place à une immunité pour ainsi dire « cellulaire ».

Mais comment s'expliquer cette circonstance dans l'augmentation de résistance des globules rouges ? Pourquoi l'immunisation peut-elle s'observer, sans que les globules rouges se modifient ? L'explication est probablement la suivante : la propriété de dissoudre les globules du lapin et d'autres animaux n'est peut-être pas le trait principal, essentiel du sérum d'anguille ; il suffit de le chauffer à 55° pendant une demi-heure pour le priver complètement de cette propriété globulicide, en laissant intacte sa toxicité pour les lapins, comme nos expériences nous l'ont démontré. Il y a des raisons de croire que la propriété globulicide est commune à beaucoup, sinon à tous les sérums vis-à-vis des globules d'autres espèces animales, mais qu'elle est seulement exaltée dans le sang d'anguille ; nous trouvons dans divers autres sérums toute une série de pouvoirs globulicides, depuis le sérum de cobaye, inactif pour le lapin, jusqu'à celui de l'anguille, en passant par le chien et la poule, dont le sérum est déjà très actif (J. Bordet). En faveur de cette conception plaide aussi l'unité de température (55°), à laquelle est détruit le pouvoir globulicide et bactéricide de tous les sérums, quel que soit l'animal qui le fournit, tandis que les autres propriétés, agglutinante ou préventive, par exemple, restent intactes. D'un autre côté, nos expériences d'immunisation avec le sérum d'anguille chauffé à 55° nous démontrent : 1° que sa toxicité n'est pas diminuée par ce chauffage, et 2° que les propriétés de l'antitoxine obtenue de cette façon ne se distinguent en aucun point de celles de l'antitoxine ordinaire ; en d'autres termes, en éliminant la propriété globulicide de la toxine, nous ne changeons point le caractère de réaction de l'organisme, qui a pour conséquence la production de l'antitoxine.

Tous ces faits forcent à admettre que le côté essentiel de

l'action du sérum d'anguille sur l'organisme n'est pas du tout dans la dissolution des globules rouges, et que, par conséquent, ce ne sont pas eux qui sont attaqués par la toxine en premier lieu; il y a probablement d'autres cellules auxquelles incombe la tâche de la détruire et qui sont étroitement liées à la production de l'antitoxine; ce sont elles qui doivent présenter par excellence des altérations de résistance et de sensibilité au poison. Parmi ces cellules, les leucocytes sont, à ce qu'il paraît, appelés à jouer un rôle très important; on est amené à cette conclusion par la comparaison avec leur attitude vis-à-vis d'autres intoxications bactériennes et minérales.

D'abord M. Metchnikoff¹ a fourni la preuve que chez la poule la toxine tétanique est fixée par les leucocytes (et les cellules génitales); la plus grande partie de l'antitoxine se trouve aussi dans les exsudats riches en leucocytes. L'injection de la toxine tétanique est suivie d'une augmentation du nombre des leucocytes dans le sang, non seulement chez les animaux réfractaires, comme la poule, mais même chez les plus sensibles, à la condition que la dose ne soit pas trop grande. En répétant les expériences bien connues de M. Wassermann, M. Metchnikoff a démontré que la substance cérébrale chargée de toxine tétanique est englobée par les phagocytes macrophages dans la cavité péritonéale et sous la peau, et reste dans leur intérieur jusqu'à digestion complète.

Les recherches de M. Stoudensky (ces *Annales*, p. 426) confirment entièrement cette observation pour une autre substance capable de fixer la toxine, le carmin. Enfin, le travail de M. Besredka² prouve d'une façon indiscutable que l'arsenic injecté aux animaux est englobé par les leucocytes, le sérum de ces animaux immunisés est antitoxique, et cette antitoxine contient aussi des combinaisons arsénicales.

Nous avons observé nous-même une réaction leucocytaire considérable après l'injection de doses non sûrement mortelles aux lapins, notamment une hyperleucocytose ou bien une faible hypoleucocytose chez les lapins immunisés, dans les premiers moments après l'injection. Malheureusement ces expériences, qui

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, n° 4, 1899.

2. Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines. Deuxième et troisième mémoires. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.

concernent la résistance des leucocytes vis-à-vis du sérum d'anguille, sont tout à fait insuffisantes pour qu'on puisse en tirer des conclusions solides, et cette question exige une étude plus approfondie.

Nous passons à présent à un autre fait observé pendant l'immunisation, et qui trouve sa confirmation dans les intéressantes études de M. Bordet.

Si l'on mélange dans un tube stérile du sérum d'anguille dilué avec un sérum antitoxique de lapin, de cobaye, de chien ou de chèvre, on voit, déjà après quelques instants, le liquide se troubler; d'abord il devient opalescent, puis le trouble est tout à fait manifeste, et enfin on distingue, dans le liquide, de petits flocons qui tombent peu à peu au fond et laissent surnager une couche parfaitement transparente. Les sérums des animaux non immunisés ne donnent ni trouble ni précipité. Dans certains cas (si l'antitoxine est faible), il ne se fait pas de précipité, mais le liquide reste légèrement troublé. En observant la formation du précipité en goutte pendant au microscope, on remarque de toutes petites granulations qui se réunissent en amas, et qui ressemblent beaucoup aux amas de microbes agglutinés. S'il y a des globules rouges dans la goutte, on peut facilement constater qu'ils sont entraînés et retenus dans les mailles de ce précipité granuleux.

Le précipité se dissout facilement dans les alcalis et les acides dilués, reste insoluble dans l'eau, les solutions de sels neutres et des carbonates alcalins. Si nous prenons plusieurs tubes contenant de la toxine et des quantités variables d'un acide quelconque, nous verrons le précipité se former là seulement où la réaction du mélange reste alcaline; si elle est neutre, il n'y a qu'une opalescence dans le liquide; la réaction acide empêche même la formation de cette dernière.

Le précipité débarrassé de la partie liquide surnageante est parfaitement inoffensif pour le lapin en injection intra-veineuse; les propriétés du liquide surnageant dépendent entièrement des quantités réciproques des deux substances mélangées, de la toxine et de l'antitoxine.

En nous arrêtant un peu sur l'analyse des conditions favorisant la formation de ce précipité, nous avons remarqué qu'on l'observait le mieux dans les cas où l'antitoxine était assez forte,

c'est-à-dire où l'immunisation était récente, de courte durée; il suffit de consulter la table pour en avoir la certitude (cas II, III, V, VIII, X, XI, cob. A, chien II, chèvre). Par contre, plus l'antitoxine est faible, plus l'immunisation est poussée avant, moins est prononcé le trouble, ou bien il ne s'observe plus du tout. Nous étions déjà près d'admettre un parallélisme complet entre la valeur de l'antitoxine et le volume précipité, lorsque nous avons vu quelques exceptions à cette régularité (par exemple dans le cas VII, le précipité était très médiocre, tandis que l'antitoxine était très forte; le chien I, III, IV, le lapin XII, tous avec une antitoxine plus ou moins forte, ne donnèrent pas de précipitation de la toxine); néanmoins, même si la formation du précipité n'est pas liée étroitement avec l'antitoxicité, nous pouvons dire que la fabrication de l'antitoxine est ordinairement suivie de l'apparition dans le sang de certains corps capables de donner avec la toxine une précipitation, une coagulation.

M. Kraus¹ fut le premier qui observa un fait semblable dans ses expériences avec les cultures filtrées ou exprimées de bacille typhique, pesteux, et du vibrion cholérique. M. Nicolle² confirma ce fait pour le *bact. coli*, et attribua une importance particulière à la substance agglutinée, qui se trouve dans les corps des microbes jeunes et qui diffuse dans le milieu liquide ambiant dans les cultures vieilles. M. Nicolle pense que la coagulation de cette substance est la cause de l'agglutination des microbes, dont les corps jouent dans le phénomène un rôle passif et ne sont qu'entraînés dans le coagulum. M. Marmorek a pu constater aussi la formation de précipités dans les cultures filtrées de streptocoques sous l'action du sérum antistreptococcique. Nous allons voir bientôt qu'il faut distinguer dans notre cas la coagulation (précipitation) de la vraie agglutination.

Les essais de chauffage du sérum antitoxique à diverses températures ont montré que la propriété coagulante ne disparaît pas à une température fixe, mais baisse peu à peu à partir de 60° et se détruit au-dessus de 70°.

Le chauffage du sérum d'anguille jusqu'à 58° diminue déjà la

1. Ueber spezifische Reactionen in Keimfreien Filtraten aus Choléra, Typhus Pest bouillon culturen, erzeugt durch homologes Serum. *Wiener klin. Woch.* N° 32, 1897.

2. Recherches sur la substance agglutinée. *Annales Pasteur*, 1898, p. 161.

quantité du précipité, tandis que, chauffé à 80° environ, ce sérum ne donne plus de précipité du tout.

Voulant nous rendre compte du phénomène de précipitation et étudier les conditions qui la provoquent, nous avons entrepris une série d'expériences en injectant dans le sang des lapins d'autres substances se rapprochant plus ou moins du sérum d'anguille, notamment du sérum de cheval et de la peptone, dont l'action physiologique sur la coagulation du sang, d'après les expériences de M. Delezeune¹ et d'autres, ressemble à celle du sérum d'anguille. Après 5-6 injections (par 3 c. c. de sérum de cheval et 5 c. c. de solution de peptone à 10 0/0 à la fois), nous avons prélevé le sang de ces animaux. Le sérum des premiers (au sérum du cheval) ne donne de précipité ni avec le sérum d'âne, ni avec le sérum normal de lapin, tandis qu'il présente une précipitation abondante avec le sérum de cheval, tout à fait analogue à celle que nous avons vu en mélangeant la toxine d'anguille avec l'antitoxine. Par contre, le sérum des lapins à la peptone ne donnait de précipité ni avec des sérums différents, ni avec la solution de peptone. M. Bordet a eu l'occasion de confirmer la formation de précipité dans le sérum de poule mélangé avec le sérum de lapin traité par des injections du sang de poule.

On voit par là que le phénomène décrit est assez général; il est en même temps spécifique, ne s'observant qu'en cas de réaction entre un sérum et son « antisérum ». Il est tout naturel de croire qu'en injectant dans le sang d'un animal donné du sang ou du sérum d'une autre espèce, nous provoquons des altérations dans son organisme, qui consistent dans l'apparition de nouvelles substances moins offensives.

La formation de ces anticorps s'observe dans le cas où les éléments étrangers, introduits dans le corps, sont capables de provoquer une certaine réaction du côté des cellules de l'organisme; à cette catégorie appartient le sérum d'anguille, de poule (pour le lapin et le cobaye) et même de cheval, puisque pour les lapins les injections successives de ce sérum dans les veines ne sont pas indifférentes; ils peuvent en mourir, si la quantité injectée est considérable. Dans le cas où la matière

1. Nouvelles recherches sur le mécanisme d'action des agents anticoagulants du groupe de la peptone. *Travaux de physiologie de Montpellier*, 1898, p. 284.

injectée ne provoque pas de réaction du côté de l'organisme, il n'apparaît dans le sang rien de semblable à ces anticorps, capables de coaguler le sérum étranger; tel est le cas pour une observation faite par M. Bordet et qu'il a bien voulu nous communiquer verbalement : le sérum du cobaye qui a reçu du sang de lapin ne donne pas de précipité avec le sérum de ce dernier.

Nous avons déjà dit plus haut que la formation de précipités doit être bien distinguée de la neutralisation de la toxine par l'antitoxine; mais il est évident que ce précipité, se formant au dépens de substances qui se trouvent à côté de l'antitoxine et de la toxine, peut entraîner mécaniquement la toxine, si celle-ci n'est pas neutralisée par l'antitoxine, comme par exemple le phosphate de chaux entraîne la toxine tétanique et diphtérique.

Nous croyons pouvoir expliquer ainsi l'existence de cette substance coagulante : elle est le produit secondaire de l'action cellulaire qui préside à la formation des corps anti-toxiques, elle se fabrique à côté d'eux et les accompagne; c'est ainsi que dans les fermentations, à côté du principal produit, il y a souvent un ou plusieurs autres composés chimiques. La même chose se passe dans l'immunisation contre le sérum d'anguille; au fur et à mesure qu'elle avance, il se forme de moins en moins de coagulines, jusqu'au moment où il ne s'en forme plus du tout, quoique le sang de l'animal immunisé possède encore de l'antitoxine en quantité appréciable.

Maintenant il faut examiner un autre phénomène qu'on observe pendant l'immunisation contre le sérum d'anguille à savoir le développement des propriétés agglutinantes chez les animaux immunisés. Mettons dans un verre de montre 1-2 gouttes de sérum d'un animal qui a reçu un assez grand nombre d'injections de toxine; introduisons dans ce sérum une goutte de sang défibriné d'anguille : à peine les liquides sont-ils mélangés que nous apercevons des îlots innombrables se former dans ce mélange homogène; ces îlots, qui deviennent de plus en plus grands, sont formés par des globules rouges agglutinés; bientôt le liquide entre les îlots est devenu tout à fait clair et transparent. Le phénomène a une analogie complète avec l'agglutination des émulsions microbiennes par les sérums spécifiques. Si nous laissons le mélange agglutiné pendant un temps assez long en le protégeant contre la dessiccation, nous

pourrons observer parfois la dissolution de l'hémoglobine dans le liquide, qui prend une teinte rose : les hématies se dissolvent peu à peu. Le même phénomène s'observe avec le sérum des lapins immunisés contre le sérum de cheval et les globules du cheval.

Le fait très intéressant a été décrit pour la première fois par M. Bordet¹ et peut être constaté dans beaucoup de cas. La propriété des sérums d'agglutiner des globules d'une autre espèce animale n'est pas, à vrai dire, une propriété nouvellement acquise à la suite de l'immunisation : elle peut exister dans beaucoup de sérums, mais à divers degrés d'intensité, de même que la propriété dissolvante. Cependant, l'injection d'un sang étranger (ou d'un sérum) à un animal exalte la propriété agglutinante et globulicide de son sérum vis-à-vis des globules du sang injecté. D'un autre côté il y a des sérums incapables d'agglutiner certains sangs ; mais il suffit d'injecter ce sang pendant quelque temps pour donner au sérum une force agglutinante considérable. Prenons par exemple le sérum d'anguille : il n'agglutine les globules du lapin et du cobaye que très tard, au moment de la dissolution. En injectant dans le péritoine des anguilles le sang de lapin ou de cobaye, nous avons tellement exalté la propriété agglutinante de leurs sérums qu'ils agglutinaient déjà presque instantanément, même après chauffage à 55° pour leur enlever leur propriété dissolvante.

La ressemblance entre ces propriétés des sérums et les pouvoirs agglutinant et bactéricide s'accroît encore davantage par le fait qu'elles se comportent de même vis-à-vis de la température : le chauffage à 55° détruit la propriété globulicide en laissant intacte la propriété agglutinante ; cette dernière ne disparaît pas à une température fixe, et diminue à partir de 60-70° jusqu'à sa disparition complète.

À quel moment la propriété agglutinante apparaît-elle dans le sang des animaux soumis à l'immunisation ? Il n'est pas possible de déduire une règle de nos observations, parfois elle apparaissait très tôt, lorsqu'il y avait beaucoup d'antitoxine dans le sang et que le sérum donnait un précipité abondant avec la toxine (voir les cas VII, VII, XIX, chèvre, chiens I et II) ; dans

1. Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibrinés. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 688.

d'autres cas, et ceux-là étaient plus nombreux, la propriété agglutinante apparaissait plus tard, succédant à l'antitoxicité, et lorsque le sérum de l'animal immunisé ne donnait plus ni trouble, ni précipité avec la toxine (cas XI', XII', et XII" XIV, XVII, XVIII, et XVIII', chiens I et I', III et IV). Quoi qu'il en soit, la propriété agglutinante n'est en relation ni avec l'antitoxine, ni avec la substance coagulante. Prenons les globules de cheval séparés du sérum; faisons-en une émulsion homogène dans de l'eau physiologique; ce mélange s'agglutinera par le sérum des lapins traités par l'injection du sérum de cheval aussi vite et aussi parfaitement que le sang entier. Par contre, faisons une semblable émulsion de globules de lapin ou de cobaye, dans le sérum de cheval; le même sérum de lapin traité ne donnera aucune agglutination.

Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer tous ces phénomènes; dans tous les cas, nous voulons seulement signaler que la formation de précipité (la coagulation) dans le sérum n'y joue aucun rôle, comme on pourrait le penser au premier coup d'œil, surtout après les recherches de MM. Kraus et Nicolle. Il est évident que la coagulation peut aussi entraîner les particules nageant dans le liquide, mais ce fait n'a rien à faire avec la vraie agglutination de globules rouges.

L'analyse de ces faits suggère involontairement l'idée que, dans les expériences de MM. Kraus et Nicolle, il faudrait peut-être distinguer la précipitation des liquides de culture du phénomène de l'agglutination microbienne. Si celle-ci dépendait exclusivement de l'insolubilisation d'une certaine substance dissoute dans le liquide, on observerait toujours la formation de précipités dans les liquides de culture filtrés sous l'action des sérums spécifiques. M. Kraus lui-même note qu'on ne voit rien de pareil.

D'un autre côté nous avons des exemples de microbes, comme le bac. tétanique, qui s'agglutinent très bien, sans qu'il y ait jamais de précipités dans le liquide des cultures de ce microbe. Enfin, dans les expériences de Nicolle, l'agglutination des cultures filtrées (la formation de coagulum) se manifestait toujours beaucoup plus lentement et plus tard que l'agglutination des microbes, et l'addition d'autres corps microbiens ou de poudres en accélérât seulement un peu la marche.

Tout ce que nous avons exposé plus haut peut être résumé ainsi :

1. Les lapins, les chiens, les chèvres et les pigeons se laissent facilement immuniser contre le sérum d'anguille; il est infiniment plus difficile d'immuniser les cobayes.

2. Dans le sang des animaux immunisés apparaît une antitoxine qui neutralise *in vitro* l'action dissolvante de la toxine sur les globules rouges du lapin, et, injectée dans le sang avec la toxine, l'empêche d'exercer son action nuisible.

3. Cette antitoxine apparaît dans le sang très tôt, déjà après 2 à 4 injections, et chez le lapin elle est à ce moment à son maximum; sa valeur en général n'est pas grande.

4. Au cours de l'immunisation prolongée, la valeur de l'antitoxine diminue progressivement, quoique la résistance des lapins contre la toxine augmente.

5. Les globules rouges des lapins immunisés deviennent moins solubles dans le sérum d'anguille que les globules neufs.

6. Cette résistance n'est pas en rapport avec la présence de l'antitoxine dans le sang de l'animal immunisé; au contraire, il s'observe un certain antagonisme entre la résistance des globules rouges et la valeur de l'antitoxine, et dans les cas où celle-ci est forte, la solubilité des globules peut même être augmentée.

7. Les injections du sérum d'anguille dans le sang sont suivies d'une diminution notable du nombre des leucocytes chez un animal neuf, et d'une augmentation ou d'une diminution insignifiante chez les lapins immunisés.

8. En mélangeant le sérum d'anguille avec une antitoxine forte, provenant d'un animal depuis peu de temps en immunisation (lapin, chèvre, cobaye, chien), on obtient un trouble et un précipité semblable à celui qui a été observé par M. Kraus dans les cultures filtrées de microbes; il est insoluble dans l'eau, les sels neutres et les carbonates alcalins, se dissout facilement dans les alcalis et les acides. Sa formation ressemble à la coagulation d'une substance dissoute dans le sérum toxique ou anti-toxique.

9. Le volume du précipité est ordinairement en rapport avec la valeur de l'antitoxine; la formation du précipité est empêchée par le chauffage de l'antitoxine à 70° pendant une 1/2 heure; de même un chauffage du sérum d'anguille à 80° le rend incoagulable par l'antitoxine; mais déjà la température de 58° diminue

notablement la propriété de donner un précipité chez la toxine comme chez l'antitoxine.

10. La propriété coagulante n'est pas liée directement à l'antitoxine; on rencontre des sérums antitoxiques qui n'en présentent aucune trace.

11. Les sérums antitoxiques acquièrent très tôt la propriété d'agglutiner et même de dissoudre les globules rouges de l'animal dont le sang (ou le sérum) a servi pour les injections; cette propriété s'accroît au cours de l'immunisation; elle peut être provoquée chez les animaux, dont le sérum n'est pas du tout agglutinant à l'état normal, par des injections du sang ou du sérum correspondant; la température qui détruit cette propriété des sérums traités correspond à celle qui empêche l'agglutination des microbes.

12. La propriété d'agglutiner les globules rouges n'a rien à faire avec la propriété coagulante, et peut être très prononcée dans des sérums qui ne coagulent pas la « toxine » correspondante.

13. L'agglutination des globules rouges n'est pas causée par la coagulation des substances dissoutes dans la partie liquide, ainsi qu'on pourrait le croire après les recherches de MM. Kraus et Nicolle.

En terminant cette étude, je me fais un devoir bien agréable de remercier chaleureusement mes chers maîtres, MM. Roux et Metchnikoff, pour leur bienveillant accueil.

APPENDICE

Lapin 1. — Poids 2,160. 9/IX. — 0,1 c. c. de sér. d'anguille frais dans le sang. 20/IX. — 2,000. Saignée (50 c. c. de sang).

Lapin 2. — Poids 1,900. 27/IV. — 0,05 dans la veine. 30/IV encore 0,1 sous la peau. 5/V. — 0,1 dans le sang. 15/V. — 0,1. 23/V. — 0,1. 30/V. — 0,225; 6/VI. — Saignée (50 c. c. de sang).

Lapin 3. — Poids 2,130. 23/IV. — 0,2 sous la peau. 25/IV encore 0,25 sous la peau. 2/V. — 0,1 dans le sang. 23/V. — 0,1. 30/V. — 0,1. 5/VI. — 0,15. 11/VI. — 0,2. 22/VI. — 0,2. 25/VI. — Saigné à blanc (poids 2,060).

Lapin 4. — Poids 1,840. 22/IV. — 0,01 sous la peau. 25/IV. — 0,1 sous la peau. 2/V. — 0,1 dans le sang. 23/V. — 0,15 sous la peau. 30/V. — 0,1; 5/VI. — 0,15; 20/VI et 26/VI, 4/VII et 11/VII. — 0,2 dans le sang (poids 2,320). 19/VII. — Saignée (50 c. c.). 26/VII. — 0,1 dans le sang. 3/VIII. — 0,15. 8/VIII et 26/VIII par 0,2. 30/VIII a été saigné (50 c. c.). Ultérieurement supportait facilement 0,4 de sérum d'anguille dans le sang.

Lapin 5. — Poids 2,400. 19/IX. — 0,1 dans le sang. 25/IX. — 0,1. 12/X. — Saigné à blanc (le poids avait baissé jusqu'à 1,600).

Lapin 6. — Poids 2,320. 4/XI. — 0,1 dans le sang. 16/XI. — 0,15. 28/XI prélevé 50 c. c. de sang.

Lapin 7. — Poids 2,020. 13/XI. — 0,2 de sér. chauffé à 55° dans le sang. 23/XI. — 0,15. 8/XII. — prélevé 50 c. c. de sang (poids 1,840). 12/XII. — 0,15 à 55° et le 19/XII 0,2 de sér. frais. 26/XII. — encore une fois prél. 50 c. c. de sang.

Lapin 8. — Poids 1,760. 13/XI. — 0,1 de sér. chauffé à 55° dans le sang. 23/XI. — 0,12. 8/XII. — 0,15. 15/XII. — Extr. 50 c. c. de sang. 17/XII. — injecté, pour essayer la résistance, 1 c. c. de sér. frais d'ang. dans la veine (de même au lapin XVIII); très malade, puis paraît se rétablir un peu. 26/XII. — Nouvelle prise de 50 c. c. de sang. Mort le 28/XII.

Lapin 9. — Poids 1,700. 9/IX. — 0,08 dans le sang. 4/X et 13/X. — 0,1 sous la peau. 24/X. — 0,15 dans le péritoine. 4/XI. — 0,15 dans le sang. 18/XI. — Tué par la saignée (poids 1,700).

Lapin 10. — Poids 2,190. 22/IV. — 0,01 sous la peau. 25/IV. — 0,2 sous la peau. 27/IV. — 0,1 dans le sang. 11/V. — 0,1. 23/V. — 0,1. 30/V. — 0,1. 5/VI. — 0,2. 11/VI. — 0,25. 20/VI. 26/VI. 9/VII et 11/VII. — 0,2. 20/VII et 28/VII. — 0,25 (poids 2,500). 2/VIII. — Prise de 50 c. c. de sang. 8/VIII. — 0,01. 17/VIII. — 0,2. 23/VIII. — Saigné à mort.

Lapin 11. — Poids 1,900. 20/VI. — 0,05 dans le sang. 26/VI. — 0,1. 11/VII. — 0,1. 18/VII. 26/VII et 3/VIII. — 0,15. 8/VIII et 16/VIII. — 0,2. 26/VIII et 3/IX. — 0,25. 11/IX. — Prise de 50 c. c. de sang (poids 2,460). 19/IX. — 0,1. 27/IX. — 0,15. 6/X. — 0,2 (poids 2,500). 14/X. — 0,25. 24/X. — 0,3 et 4/XI. — 0,35. 15/XI. — Prise de 50 c. c. de sang. 28/XI. — 0,2 sous la peau. 8/XII. — 0,25 dans le sang. (A commencé à maigrir; poids le 7/XII, 1,940). 17/XII. — Tué par prise de tout le sang.

Lapin 12. — Poids 2,240. 17/VIII. 26/VIII. 2, 11, 19 et 27/X. — 0,2 de sér. chauffé à 60° dans le sang. 6 et 14/X. — 0,3 et 0,35 du même sér. 29/X. — Prise de 50 c. c. de sang (poids 2,500). 4/XI. — 0,2 sér. chauffé à 58°. 6/XI. — 0,2 chauffé à 55°. 16/XI. — 0,25 à 55°. 23 et 30/XI. — 0,3 et 0,4 à 55°. 11/XII. — Prise de 50 c. c. de sang. 19/XII. — 0,25 à 55°. 24/XII. — Encore une prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 13. — poids 2,160. 2/IX. 11 et 19/IX. — 0,1. 25/IX. — 0,15. 4/X. — 0,15 dans le péritoine. 13/X. — 0,2 dans le sang. 24/X. — 0,25. 10/XI. — Prise de 50 c. c. de sang (poids 2,300). 17/XI. — 0,15. 28/XI. — 0,2. 8/XII. — 0,25. 16/XII. — 0,35. 17/XII. — Prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 14. — Poids 1,880. 3/X. — 0,1 dans le sang. 15/V. 24 et 30/IV. — 0,1. 5/VI. 12, 22, 1/VII et 11/VII. — 0,2. 20 et 28/VII. — 0,25. 5/VIII. — Prise de 50 c. c. de sang (poids 2,500). 12/VIII. — 0,1. 26/VIII et 3/IX. — 0,2. 11/IX et 19/IX. — 0,25. 27/IX. — 0,3. 6/X. — 0,35. 14/X. — 0,4. 31/X. — (Poids 2,600). Prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 15. — Poids 1,800. 28/VI. 28/VII. 18/VIII. 2, 11 et 19/IX. — 0,2 de sér. d'ang. frais mélangé avec 0,1 de liquide de Gram dans la veine. 25/IX et 4/X. — 0,25 sér. + 0,1 l. de Gr. 13/X. — 0,2 de sér. sans iode. 24/X. 4 et 16/XI. — 0,3 sér. pur. 28/XI. — 0,4. 11/X. — Prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 16. — Poids 1,720. 19/IX et 25/IX. — 0,15 de sér. d'ang. chauffé à 60° dans le sang. 6 et 14/X. — 0,2 id. 24/X. — 0,25 id. 4/XI. — 0,3 id. 6/XI et 16/XI. — 0,1 de sér. chauffé à 55°. 28/XI. — 0,15 à 55°. 12/XII. — Prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 17. — Poids 2,260. 12/VII. — 0,1 dans le sang. 20 et 28/VII. — 0,1. 7/VIII et 16/VIII. — 0,15. 26/VIII et 2/IX. — 0,2. 11, 19 et 25/IX. — 0,25 (poids 2,500). 4/X. — 0,3. 14/X. — Prise de 50 c. c. de sang. 24/X. — 0,2. 4/XI. — 0,3. 16/XI. — 0,4. 28/XI. — 0,5. 8/XII. — Prise de 50 c. c. de sang. 19/XII. — (Poids 2,550). 0,3. 23/XII. — Pour essayer la résistance contre le poison, injection de 1,5 c. c. de sér. frais dans la veine; après quelques mouvements cloniques, se rétablit vite et pesa le 28/XII 2,600.

Lapin 18. — Poids 1,800. 4/VII. — 0,5 dans le sang. 16 et 26/VII. — 0,1. 3, 7 et 16/VIII. — 0,15. 26/VIII et 2/IX. — 0,2 (poids 2,550). 9, 15 et 25/IX. — 0,25. 4 et 13/X. — 0,3. 24/X. — 0,35. 4/XI. — Prise de 50 c. c. de sang. 17/XI. — 0,2. 28/XI. — 0,3. 8/XII. — 0,35. Depuis ce moment, le poids allait en diminuant et au 5/XII baissa de 2,500 à 2,000. 5/XII. — Prise de 50 c. c. de sang. 17/XII. — Pour éprouver la résistance, injection de 1 c. c. de sér. d'ang. à la fois dans la veine (poids 1,900). Le lapin était apparemment peu malade après l'injection et commença bientôt à manger, mourut quand même 3 jours plus tard. Rien de pathologique à l'autopsie. (Amaigrissement).

Lapin 19. — Poids 2,060. 11, 19 et 25/IX. — 0,15 de sér. chauffé à 60°. 4, 14 et 24/X. — 0,2, 0,25 et 0,3 id. 2/XI. — Prise de 50 c. c. de sang.

Cobaye A. — Poids 500. 26/VI et 5/VII. — 0,05 sous la peau. 20/VIII. — 0,075. 28/VII, 7, 17 et 27/VIII. — 0,1. 4, 14 et 28/X. — 0,1 dans le péritoine. 16/XI. — Prise de 5 c. c. de sang. 30/XI et 15/XII. — 0,1 dans le périt. 31/XII. — Tué par prise de sang.

Chien 1. — Poids env. 15 kilos. 16/IX et 27/IX. — 0,2 sous la peau. 6 et 16/X. — 0,3. 27/X. — Prise de 80 c. c. de sang. 2/XI. — 0,3 dans la veine. 9/XI. — 0,4 id. 17/XI. — 0,5 id. 2/XII. — Prise de 100 c. c. de sang.

Chien 2. — Poids env. 15 kilos. 21, 23 et 30/XI. — 0,5 de sér. chauffé à 55° sous la peau. 3/XII. — Prise de 100 c. c. de sang.

Chien 3. — Poids 12 kilos. 25 et 30/XI. — 0,5 chauffé à 55° sous la peau. 3/XII. — Prise de 100 c. c. de sang.

Chien 4. — Poids 8 kilos. 25 et 30/XI. — 0,5 de sér. frais sous la peau. 3/XII. — Prise de 80 c. c. de sang.

Chèvre. 22/XI. — 0,5. 23/XI. — 0,25. 26/XI. — 40. 30/XI. — 0,4. 6 et 11/XII. — 0,5. 24/XII. — Prise de 100 c. c. de sang.

Poules I et II ont reçu dans le péritoine : 15/VIII et 30/VIII. — 0,1. 9, 17, 25/IX et 6/X. — 0,15. 24/X. — 0,2. 31/X. I. Tuée par prise de sang. II. Reçut encore 0,2 et est tuée 16 jours après la dernière injection.

MARQUE des ANIMAUX	DOSE de TOXINE REÇUE	ANTITOXICITÉ <i>in vitro</i> (Contre la dissolution)	ANTITOXICITÉ <i>in vivo</i> (Pour le lapin)	REMARQUES	TROUBLE et PRÉCIPITÉ	AGGLUTINATION	SOLUBILITÉ des GLOBULES ROUGES
Lapin I....	0,8 ¹	Null.	Null.		Trouble faible.	Très faible.	
— II....	0,675	10 : 1	Un peu infér. à 20 : 1	Lapin avec 0,4 de toxine + 4,0 d'antitoxine; mort en 4 minutes. Lapin avec 0,24 de toxine + 4,8 d'antitoxine; était ma- lade, survit.	Abond. précipi- té.		
— III....	1,3				Précipité très abond.		
— IV....	2,2	30 : 1		Pas d'expérience <i>in vivo</i> .	Abond. précipi- té.		Beaucoup moindre que le sang neuf.
— V....	0,2	12 1/2 : 1	12 1/2 : 1		Abond. précipi- té.	Pas d'agglu- tination.	
— VI....	0,25	20 : 1	inférieure à 20 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 4,0 d'antitoxine; mort en 2 jours.	Abond. précipi- té.		
— VII..	0,25 (chauffé à 55°)	20 : 1	20 : 1	Lapin avec 0,1 de toxine + 4,0 d'antitoxine; était malade.	Trouble et précipité.	Agglutine vite	
— VII'..	0,6	environ 15 : 1	15 : 1		Précipité mé- diocre.	Lentement.	Beaucoup moindre que le sang neuf.
— VIII..	0,37 (chauffé à 55°)	20 : 1	20 : 1		Abond. précipi- té.	Lentement.	Beaucoup plus facile que le sang neuf.
— VIII'.	1,37	environ 15 : 1	15 : 1		Abond. précipi- té.	Agglutine ins- tamment.	Beaucoup moindre que le sang neuf.
— IX...	0,58	33 : 1		Pas d'expérience <i>in vivo</i> .	Trouble et précipité.	Lentement mais bien.	
— X....	2,4	30 : 1	30 : 1		Assez grand précipité.		Aussi bien que le sang neuf ² .
— XI...	4,6	25 : 1	25 : 1		Abond. précipi- té.		Aussi bien que le sang neuf.

MARQUE des ANIMAUX	DOSE de TOXINE REÇUE	ANTITOXICITÉ <i>in vitro</i> (contre la dissolution)	ANTITOXICITÉ <i>in vivo</i> (Pour le lapin)	REMARQUES	TROUBLE et PRÉCIPITÉ	AGGLUTINATION	SOLUBILITÉ des GLOBULES ROUGES
Lapin XI'..	2,95	inférieure à 50 : 1	inférieure à 50 : 1	Lapin avec 0,12 de toxine + 6,0 d'antitoxine; mourut cachectique après 18 jours.	Pas de précipité.	Agglutine instantanément.	Aussi bien que le sang neuf.
— XI'..	3,4	20 : 1 ³	inférieure à 20 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 4,9 d'antitoxine; mort en 6 jours.	Petit trouble et précipité.	Agglutine très vite.	Moins bien que le sang neuf.
— XII'..	4,8 (chauffé à 60°)	50 : 1 ⁴	40 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 6,0 d'antitoxine; mort en 45 jours.	Médiocre.		Plus difficilement que le sang neuf.
— XII'..	3,25 (à 50° à près.)	entre 20 : 1 et 30 : 1 ⁵	30 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 42,0 d'antitoxine; survit.		Agglutine instantanément.	
— XII'..	3,5 (chauffé à 55°)	80 : 1	inférieure à 60 : 1	Lapin avec 0,1 de toxine + 2,0 d'antitoxine; était malade.	Nul.		
— XIII'..	4,5	Presq. nulle ⁶	inférieure à 50 : 1	Lapin avec 0,45 de toxine + 9,0 d'antitoxine; mort en 3 jours.	Nul.	Agglutine instantanément.	Presque plus.
— XIII'..	2,0	au-dessous de 50 : 1	beaucoup inf. à 50 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 40,0 d'antitoxine; mort en 48 heures.	Nul.	Faible.	Aucune différence avec le sang neuf.
— XIV'..	3,95	40 : 1	inférieure à 40 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 12,0 d'antitoxine; mort en 15 jours.	Nul.	Agglut. lentement.	Aucune différence avec le sang neuf.
— XV'..	(avec 1. de Gram) 3,2	entre 40 : 1 et 50 : 1	40-50 : 1		Trouble sans précipité.	Agglut. lentement.	Beaucoup moins bien que le sang normal.

1. Une seule injection dans la veine a été insuffisante pour provoquer des propriétés antitoxiques

2. Malheureusement les quantités de sérum d'augmentation dans l'expérience sur la dissolution ont été prises trop grandes.

3. L'augmentation d'antitoxicité n'a apparu que dans ce cas, où le lapin fut saigné mourant.

4. La petite valeur de l'antitoxicité s'explique peut-être par le chauffage du sérum à une temp. trop élevée qui détruit déjà la toxicité.

5. L'injection du sérum moins affaibli a provoqué une augmentation d'antitoxicité.

6. Dans ce cas il n'y avait pas de formation d'antitoxine pour des raisons inconnues.

Lapin XVI.	4,25 à 60° et 0,35 à 55° ⁷	40 : 1	40 : 1	Lapin avec 0,4 de toxine + 3,0 d'antitoxine; état ma- lade.	Trouble.	Agglutine-ins- tantanément.
— XVII.	2,05	50 : 1	inférieure à 50 : 1		Nul.	Agglutine-ins- tantanément. Aussi bien que le sang normal.
Lapin XVII.	3,4	inférieure à 80 : 1	inférieure à 80 : 1	Lap. av. 0,4 tox. + 5,0 d'an- titoxine; état très malade.	Nul.	Agglutine-ins- tantanément. Aussi bien que le sang normal.
— XVII ^a .	3,7			Pas d'épreuves d'antioxi- cité.	Nul.	Agglutine-ins- tantanément. Un peu moins que le sang neuf.
— XVIII.	2,6	inférieure à 30 : 1	inférieure à 30 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 9,0 d'antitoxine; meurt au bout de 9 jours.	Nul.	Agglutine-ins- tantanément. Beaucoup plus difficile- ment que le sang neuf. Insolubilité encore plus prononcée.
— XVIII.	3,45	60 : 1	inférieure à 60 : 1	Lap. av. 0,45 de toxine + 9,0 d'antitox.; m. en 7 jours.	Nul.	Agglutine-ins- tantanément. Aussi bien que le sang neuf.
— XVIII ^a .	4,45	inférieure à 80 : 1	inférieure à 80 : 1	Lap. av. 0,2 de tox. + 42,0 d'antitox., survécuit; un autre avec 0,2 de tox. + 8,0 d'antitox.; très mal.	Nul.	Agglutine-ins- tantanément. Aussi bien que le sang neuf.
— XIX.	4,2 (chauff. à 60°) ⁸	40 : 1	inférieure à 20 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 6,0 d'antitoxine; mort au bout de 4 jours.	Trouble et précipité.	Agglutine-ins- tantanément.
Cobaye A...	1,2	45-20 : 1			Trouble et préc. abon- dant.	Faible.
Chien I,...	4,2	30 : 1	30 : 1		Trouble, pas de préc.	Assez forte.
— I'....	2,4	45 : 1	inférieure à 45 : 1	Lap. av. 0,2 de tox. + 3,0 d'antitox.; état un peu mal.	Nul.	Pas d'aggluti- nation.
— II....	4,5 (chauffé à 55°)	40-50 : 1	beaucoup inf. à 40 : 1	Lap. av. 0,2 de tox. + 8,0 d'antitox.; m. en 3 jours.	Précipité as- sez grand.	Agglutine-ins- tantanément.
— III....	4,0 (chauffé à 55°)	inférieure à 40 : 1	beaucoup inf. à 40 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 8,0 d'antitoxine; mort au bout de quelques heures.	Nul.	Agglutine-ins- tantanément.
— IV....	4,0	inférieure à 40 : 1	beaucoup inf. à 45 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 9,0 d'antitoxine; tuent très vite.	Nul.	Agglutine-ins- tantanément.
Chèvre	3,45	40 : 1	40-42 : 1		Abondant.	Fondroyant.

7. En réalité il n'a reçu que 0,35 de sérum d'augmentation actif.

8. Le sérum d'anguille, dans ce cas, a été chauffé à une température très élevée.

LA PHAGOCYTOSE CHEZ LE PIGEON

A L'ÉGARD DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE ET DU BACILLE HUMAIN

(CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ NATURELLE)

PAR M. DEMBINSKI

(Travail du laboratoire de M. le professeur Grancher.)

Historique. — Il existe une série de travaux importants sur le rôle des leucocytes dans la tuberculose.

M. Metchnikoff¹, en 1888, a étudié sur le spermophile le rôle phagocytaire des cellules géantes. Il a démontré que les bacilles tuberculeux dégénèrent à l'intérieur des cellules géantes. A côté des bacilles normaux, il a vu des bacilles qui prennent une couleur rose faible (double coloration à la fuchsine et bleu de méthylène), d'autres qui ne prennent aucune couleur ou se colorent en bleu. Enfin, il a constaté, à l'intérieur des cellules, des corps jaunes, ayant une forme de boudins, et rappelant par leur configuration générale les bacilles tuberculeux.

Quant au stade initial de la phagocytose, M. Metchnikoff a observé les phénomènes suivants : lorsqu'on injecte la culture tuberculeuse sous la peau, dans la chambre antérieure de l'œil ou dans le sang, les bacilles sont immédiatement englobés par les leucocytes polynucléaires ; ensuite apparaissent les grands leucocytes mononucléaires, qui à leur tour englobent des bacilles et même des leucocytes polynucléaires avec leurs bacilles.

M. Borrel², qui a étudié la phagocytose dans le poumon et dans le rein du lapin, est arrivé aux mêmes résultats : au début il a vu des leucocytes polynucléaires remplis de bacilles ; ces leucocytes commencent à dégénérer vers le 3^e jour : leur noyau se fragmente en gouttelettes chromatiques et devient trouble. Vers le 5^e jour, les leucocytes polynucléaires

1. METCHNIKOFF, *Ueber die phagocytaire Rolle der Tuberkelriesenzelle. Virchow's Archiv.* 1888, t. CXIII, p. 63.

2. BORREL, Tuberculose pulmonaire expérimentale. *Ces Annales*, 1893 et 1894.

disparaissent, leur rôle est terminé. Dès la fin du 2^e jour, on constate l'arrivée de nouveaux éléments, dont le rôle est plus durable : les grands leucocytes mononucléaires (à noyau unique vésiculeux, à protoplasme abondant).

Les conclusions, auxquelles sont arrivés MM. Kostenitch et Wolkow¹ dans leur travail sur le développement du tubercule expérimental, ne concordent pas avec celles des auteurs précédents. Tandis que ces derniers ont observé très facilement l'englobement des bacilles par les leucocytes polynucléaires et mononucléaires, MM. Kostenitch et Wolkow n'ont pas pu parvenir à voir les leucocytes englobant des bacilles; ils n'ont observé que des rapports de voisinage entre les leucocytes et les bacilles.

Tout récemment M. Broden² a publié ses recherches sur l'histogénèse du tubercule où il dit que, dans les premiers jours de la réaction, les bacilles, pour la plus grande part, sont englobés dans les leucocytes, pour la part la plus petite, dans les éléments immobiles. Quelques jours plus tard, les leucocytes renfermant des bacilles disparaissent, et l'on ne trouve plus de bacilles que dans les éléments immobiles. Ces derniers entrent en division, fournissant un néoplasme qui constitue le tubercule.

Ce court résumé suffit à montrer que le rôle des phagocytes dans la tuberculose est loin d'être élucidé.

Ce mémoire est une contribution à cette étude. Nous avons observé la phagocytose chez le pigeon et comparé la réaction phagocytaire à l'égard du bacille des mammifères et du bacille aviaire.

Technique. — La culture du bacille aviaire provenant du pigeon et celle du bacille de Koch provenant du lapin nous ont été obligeamment fournies par MM. les docteurs Ledoux-Lebard et Auclair.

Nous avons réensemencé la première dans le bouillon, la seconde sur la pomme de terre glycinée, et nous les avons injectées trois semaines après. Pour l'injection de la culture aviaire on la délayait dans deux fois son volume de bouillon stérile; quant à la culture du bacille humain, on en prélevait une parcelle qui

1. KOSTENITCH et WOLKOW, Recherches sur le développement du tubercule expérimental. *Archives de méd. exp. et d'anatomie path.*, 1892, p. 741.

2. BRODEN, Recherches sur l'histogénèse du tubercule. *Archives de méd. exp. et d'anat. path.*, 1899, n° 1.

servait à faire une émulsion dans du bouillon stérile. L'injection était faite dans la région sternale après désinfection de la peau.

Tout d'abord nous avons étudié la phagocytose par la prise de quelques gouttes d'exsudat, prélevées après des intervalles de temps variables.

Il n'est pas possible d'étudier l'évolution de la phagocytose sur un seul pigeon, car en prenant de l'exsudat plusieurs fois au même oiseau, on s'expose à le contaminer par d'autres microbes et à troubler l'évolution normale de la phagocytose.

Nous inoculons la culture de la tuberculose à une série de pigeons en ne faisant qu'une prise d'exsudat à chacun d'eux, mais au bout de différents intervalles de temps. En procédant

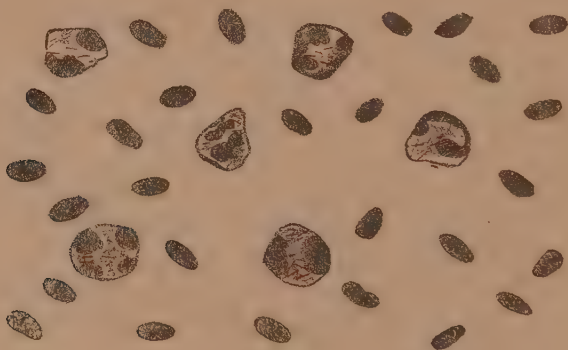


Fig. 1

La phagocytose polynucléaire au bout de 24 heures chez le pigeon inoculé avec le bacille aviaire (frottis).

ainsi, nous obtenions une série de préparations, qui nous permettaient de suivre l'évolution de la phagocytose.

Pour contrôler ces premiers résultats, nous répétions cette expérience sur une nouvelle série de pigeons, dont l'exsudat était recueilli et examiné après les mêmes intervalles.

Les préparations étaient fixées par le mélange d'alcool et d'éther, colorées par la fuchsine, traitées par l'acide sulfurique à 20 0/0 et l'alcool, et colorées enfin au bleu de méthylène.

Dans cette étude, l'examen des gouttes d'exsudat, quoique très instructif, est insuffisant. Nous avons fait, à différents intervalles de temps après l'inoculation, l'examen du tissu inoculé par la méthode de coupes. Un fragment de la peau et du tissu cellu-

laire sous-cutané était plongé pendant deux heures dans le mélange suivant :

Eau bouillante.....	100 grammes.
Bi-chlorure de mercure.....	7,5 —
Ac. acétique pur.....	5 —

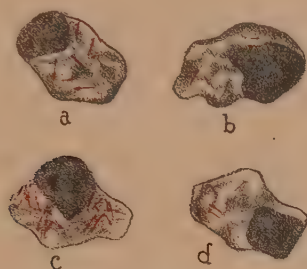


Fig. 2.

La phagocytose mononucléaire au bout de 5 jours chez le pigeon inoculé avec le bacille aviaire (frottis).

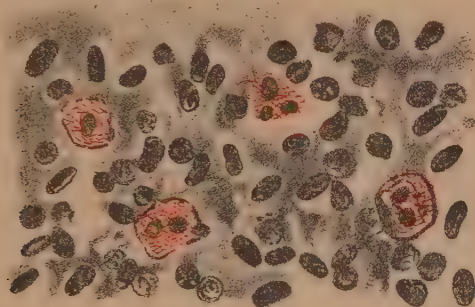


Fig. 3.

La phagocytose polynucléaire au bout de 24 heures chez le pigeon inoculé avec le bacille aviaire (coupe).

puis dans l'alcool à 90° pendant 24 heures, dans l'alcool absolu pendant quatre heures, dans l'huile de cèdre pendant 24 heures, et enfin dans la paraffine fondant à 50° et renouvelée au bout de 3 heures.

Les coupes étaient colorées comme les lamelles d'exsudat, à la fuchsine et au bleu de méthylène.

Recherches sur le bacille aviaire. — Nous avons inoculé sous la peau 1 c. c. de la culture du bacille aviaire à une série de 20 pigeons.

Pendant les 15 premiers jours après il n'y a pas eu de réaction macroscopique. Ce n'est que plus tard, 3 semaines, un mois après, qu'on vit apparaître, au lieu d'injection, un nodule dur et blanchâtre, qui, primitivement, possédait le volume d'une lentille, mais qui, ultérieurement, atteignait parfois le volume d'une noisette ou même plus.

Une demi-heure après l'inoculation, à l'examen microscopique de l'exsudat, on observe dans chaque préparation beaucoup de bacilles libres et quelques leucocytes polynucléaires, mais pas de phagocytose.

Au bout de 2 heures, on constate beaucoup de bacilles libres et des leucocytes polynucléaires plus nombreux qu'au 1^{er} examen. Quelques leucocytes polynucléaires ont englobé des bacilles, mais la phagocytose est en général faible. On voit de temps en temps, quoique très rarement, des leucocytes mononucléaires à noyau pâle et protoplasma abondant, mais jamais ces leucocytes n'englobent de bacilles, pendant les 2 premiers jours.

Même résultat, avec une leucocytose encore plus prononcée, pour l'examen de l'exsudat prélevé au bout de 5 heures.

L'exsudat de 24 heures contient plusieurs leucocytes polynucléaires remplis de bacilles (fig. 1). Il y a çà et là quelques leucocytes mononucléaires, mais ils ne présentent pas de bacilles englobés.

Ces leucocytes mononucléaires deviennent plus abondants dans l'exsudat de 48 heures. Ils commencent à présenter des bacilles englobés. Il y a encore beaucoup de polynucléaires.

Le 4^e jour, le nombre de grands leucocytes mononucléaires s'est encore accru. La phagocytose mononucléaire est aussi beaucoup plus prononcée. Les polynucléaires diminuent et leurs noyaux dégénèrent en se fragmentant en grains chromatiques. On remarque quelques mononucléaires englobant des leucocytes polynucléaires avec leurs bacilles.

Le 5^e jour, on ne voit presque que des leucocytes mononucléaires, avec les noyaux se fragmentant en grains chromatiques, englobant des bacilles dans leur protoplasme (fig. 2 *a, b, c, d*) ou quelquefois dans le noyau (fig. 2 *a.*) Les leucocytes polynucléaires diminuent de plus en plus, et enfin ils disparaissent, tandis que les leucocytes mononucléaires persistent indéfiniment.

Les bacilles libres diminuent de plus en plus, mais on observe toujours quelques bacilles libres, non englobés.

Les coupes des tissus inoculés, dont on fait l'ablation après des intervalles de temps croissants, permettent également de suivre les phases successives de la phagocytose et de contrôler les résultats fournis par l'étude de l'exsudat.

Sur les coupes du tissu prélevé 24 heures après l'inoculation, on distingue nettement les leucocytes polynucléaires englobant des bacilles réunis en amas épais, et remplissant le corps protoplasmique, tandis que le noyau est entouré par la masse parasite (fig. 3).

En résumé, la phagocytose sous-cutanée chez le pigeon est surtout polynucléaire pendant les 2 premiers jours; vers le 3^e, les leucocytes polynucléaires commencent à dégénérer, et vers le 5^e ils disparaissent.

Les leucocytes mononucléaires apparaissent vers le 3^e jour et persistent indéfiniment.

On voit que la phagocytose chez le pigeon est analogue à celle qu'ont observée M. Metchnikoff sous la peau du spermophile et M. Borrel dans le sang du lapin; cependant elle en diffère par certains détails.

Tandis que ces savants ont observé la réaction phagocytaire immédiatement après l'injection des bacilles, la phagocytose chez le pigeon est nulle au bout d'une demi-heure, elle est faible au bout de 2 à 5 heures, et elle ne s'accuse nettement qu'après 18 à 24 heures. M. Borrel n'a vu de grands leucocytes mononucléaires que dès la fin de la 2^e journée, tandis que nous avons remarqué leur présence dès le début de la réaction, mais ils étaient très rares et nous ne les avons jamais vus englobant des bacilles pendant les 2 premiers jours.

Recherches sur le bacille humain. — Nous avons inoculé de même avec le bacille humain une série de 20 pigeons, et nous avons répété les expériences qui précèdent.

Au bout d'une demi-heure, on constate une grande quantité de bacilles libres, beaucoup de leucocytes polynucléaires et de mononucléaires. La phagocytose est nulle, mais on remarque une tendance du côté des leucocytes mononucléaires à entourer les groupes des bacilles.

Au bout de 2, 5 et 18 heures, mêmes phénomènes. Après 24 heures, on trouve des bacilles libres, des leucocytes polynu-

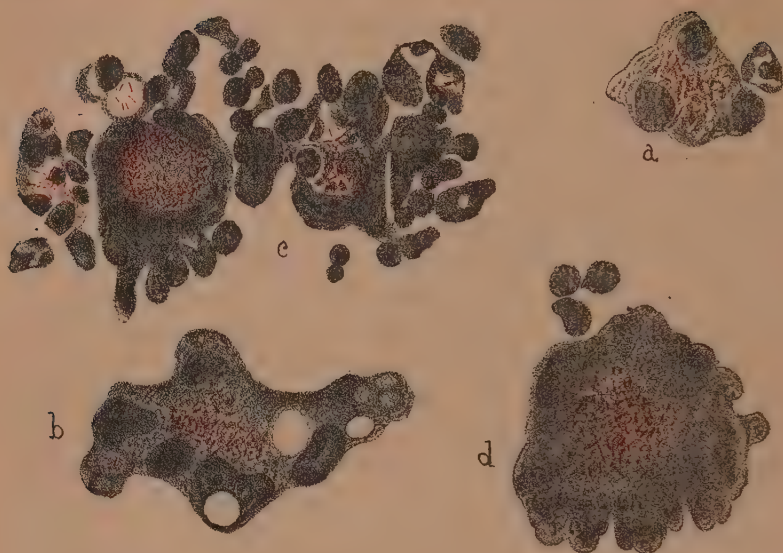


Fig. 4. — Une série de cellules géantes *a*, *b*, *c*, *d*, au bout de 24 heures chez le pigeon inoculé avec bacille humain (frottis).

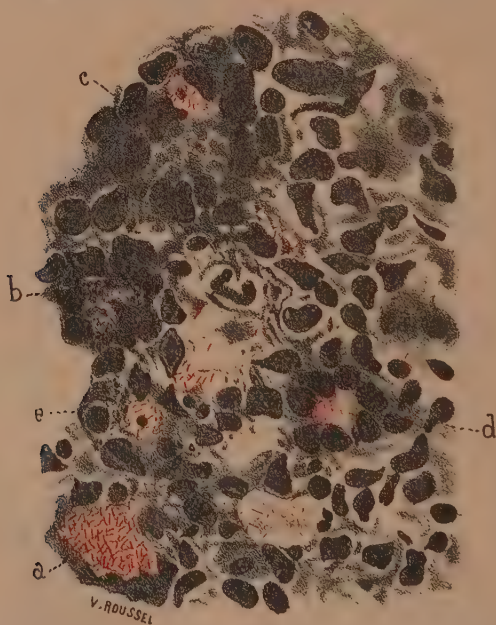


Fig. 5. — Plusieurs cellules géantes au bout de 24 heures chez le pigeon inoculé avec le bacille humain (coupe).

cléaires englobant des bacilles; mais, en outre, on constate un phénomène particulier : les leucocytes mononucléaires, qui déjà au bout d'une demi-heure commençaient à circonscrire des groupes de bacilles, s'entassaient bientôt en rangées circulaires autour de ces bacilles, qu'ils emprisonnent, formant comme une muraille épaisse dans laquelle les contours des cellules finissent par se confondre et devenir indistincts. Ce sont de véritables cellules géantes. On peut suivre l'évolution de ces cellules depuis les formes les plus simples jusqu'aux plus compliquées.

Il y a des cellules composées de 3, 6 leucocytes mononucléaires. Dans certaines cellules, ces leucocytes commencent à dégénérer, à se fragmenter en grains chromatiques, enfin dans quelques cellules ils ont perdu leurs contours et sont devenus indistincts (fig 4 *a, b, c, d.*) Les leucocytes polynucléaires ne prennent pas part à la formation de ces cellules géantes.

Les jours suivants, on rencontre de temps en temps des polynucléaires et des mononucléaires englobant des bacilles, mais en général la phagocytose est faible du côté des leucocytes isolés; au contraire, la formation des cellules géantes est de plus en plus prononcée. Le nombre de bacilles libres, très abondant dans les premières heures de réaction, devient faible ensuite : presque tous les bacilles sont inclus à l'intérieur des cellules géantes; mais cependant on en trouve toujours çà et là de libres.

Cette formation de cellules géantes s'observe aussi et mieux encore sur les coupes des tissus inoculés. La rapidité avec laquelle elle se fait est vraiment remarquable. Au bout de 24 heures, une de nos coupes du tissu sous-cutané au niveau de l'inoculation présentait déjà 5 ou 6 de ces cellules géantes, à noyaux périphériques entourant les amas de bacilles infiltrés dans la portion centrale dégénérée de la cellule (fig. 5).

Ces expériences montrent combien la réaction phagocytaire est différente chez le pigeon, suivant qu'on l'inocule avec le bacille aviaire ou avec le bacille humain. Après l'inoculation avec le bacille aviaire, la phagocytose est très active et l'on peut y distinguer 3 stades : elle est d'abord polynucléaire, puis mixte et enfin mononucléaire. Après l'inoculation avec le bacille humain, dès le début apparaissent à la fois des leucocytes polynucléaires et mononucléaires, c'est une leucocytose mixte ini-

tiale. Quant à la phagocytose, elle n'est pas marquée, si l'on considère les leucocytes isolés. On voit bien quelques leucocytes polynucléaires et plus tard des mononucléaires englobant des bacilles, mais en somme le fait est rare. Au contraire, il y a ici comme une action collective des leucocytes qui est très manifeste. En effet, dès les premières heures, les leucocytes mononucléaires tendent à se ranger en cercle autour des bacilles; au bout de 24 heures, les amas circulaires sont manifestes, la fusion des cellules est assez complète pour créer de véritables cellules géantes dont le nombre augmente de plus en plus.

Nous ignorons actuellement sur quoi repose la différence de virulence des bacilles humain et aviaire à l'égard de certaines espèces animales. Les faits que nous avons étudiés nous paraissent être une contribution à l'étude de cette question. Ils nous montrent que, dès son introduction dans l'organisme du pigeon, le bacille révèle déjà son origine aviaire ou humaine par la réaction cellulaire qu'il provoque. Si c'est le bacille aviaire, la phagocytose est impuissante à arrêter le développement de la maladie, soit que les cellules ne puissent digérer les bacilles englobés qui conservent leur vitalité, soit qu'il y ait trop de bacilles non englobés. Si c'est le bacille humain, il est aussitôt bloqué et rendu inoffensif par les nombreux leucocytes dont l'entassement forme la cellule géante, qui est considérée comme un moyen phagocytaire beaucoup plus puissant que les leucocytes isolés.

En terminant notre étude, nous voulons exprimer ici notre profonde reconnaissance à M. le professeur Grancher pour l'hospitalité qu'il a bien voulu nous offrir dans son laboratoire, à M. Metchnikoff pour l'intérêt qu'il nous a témoigné, et à M. le Dr Ledoux-Lebard pour la bonté avec laquelle il a guidé nos premiers pas dans la voie des recherches bactériologiques.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE SORT DES TOXINES ET DES ANTITOXINES INTRODUITES DANS LE TUBE DIGESTIF DES ANIMAUX

PAR LE D^r G. CARRIÈRE
Agrégré des Facultés de médecine.

(Travail du laboratoire de M. le Dr Calmette, à l'Institut Pasteur de Lille.)

I

DU SORT DES TOXINES INTRODUITES DANS LE TUBE DIGESTIF

De nombreux expérimentateurs, depuis longtemps déjà, ont été frappés de la façon dont les animaux supportent certaines toxines, quand celles-ci sont introduites dans le tube digestif.

Déjà, en 1888, M. Charrin avait montré que les animaux, sensibles à l'action du bacille pyocyanique, peuvent ingérer impunément de grandes quantités des produits solubles sécrétés par ce microbe.

En mai 1896, M. Gibier, dans une note succincte (*Comptes rendus*, p. 1073), établit que le chien, le lapin et le cobaye supportent, sans danger, l'introduction rectale de doses énormes de toxine tétanique, et cela sans acquérir l'immunité.

La même année (juin 1896), M. Charrin (*Arch. de Phys.*, p. 597) arrive aux mêmes conclusions et essaie de donner une explication expérimentale de l'innocuité de la toxine ingérée. M. Gibier avait conclu, très vaguement, que « la muqueuse rectale retient les toxines et les antitoxines, si elle ne les détruit pas. Si elle les absorbe, il faut admettre que, transportées au foie, ces substances sont détruites par cet organe ». M. Charrin essaie de démontrer l'action puissante de l'épithélium intestinal et prévoit celle des ferments et des sucs digestifs.

Revenant sur ce sujet avec M. Lefèvre (*Soc. de Biol.*), en 1898, il pense que les sécrétions gastriques sont capables de modifier

la toxine tétanique. Les saprophytes intestinaux agiraient dans le même sens. Il conclut alors qu'il faut voir dans ces faits l'explication de l'innocuité de la toxine tétanique ingérée.

M. Ransom, l'année dernière (*Deutsche med. Woch.*), a constaté qu'on pouvait impunément injecter dans l'intestin du cobaye des doses 100,000 fois mortelles de toxine tétanique. A son avis, la toxine tétanique sort du tube digestif sans être modifiée.

Nencki, Sieber et Schoumow-Siemanowski (*Cent. f. Bakt.*, XXIII, 19) ont étudié eux aussi l'action des divers sucs digestifs sur la toxine tétanique. Ils pensent que chacun d'eux possède une action atténuante ou destructive sur ce poison, mais que le rôle principal, dans cette destruction, est joué par la bile, le suc pancréatique, et surtout par le mélange de ces deux derniers.

Tout récemment, M. Charrin (*Comptes rendus* 1899) vient de revenir sur ces faits et admet aujourd'hui avec M. Metchnikoff que les microbes intestinaux jouent un rôle très important dans l'atténuation ou la destruction des toxines introduites dans le tube digestif.

D'un autre côté, Lacerda, Weir Mitchell, Fayrer, Brinton, Calmette ont démontré qu'on pouvait introduire sans danger, dans l'estomac des animaux, des doses plusieurs fois mortelles de venin. Fraser (*Brit. med. J.* 1893, p. 416), après avoir confirmé les conclusions de ses prédécesseurs, va encore plus loin qu'eux et prétend que « non seulement le venin est inerte quand on l'introduit dans l'estomac », mais encore « qu'il donne aux animaux une certaine immunité », très légère ; il démontre ensuite que c'est la bile qui détruit le venin dans le tube digestif, et il considère la bile comme un véritable antidote du venin.

Gibier, dans les *Archives de l'Institut Pasteur du Connecticut*, en 1896, confirma les conclusions de Fraser.

M. Wehrmann, dans un très consciencieux travail du *Laboratoire de M. le Dr Calmette* et publié dans ces *Annales* (1897 et 1898), a étudié *in vitro* l'action des divers ferments digestifs sur le venin. Il conclut que la ptyaline, la bile, la pancréatine ont sur le venin une action destructive énergique ; la pepsine est de beaucoup moins active, l'oxydase leucocytaire totalement inactive.

Il y a donc sur ce sujet nombre d'affirmations insuffisamment précisées au point de vue expérimental : ce qui n'a rien d'étonnant, étant donné le vague de la question posée et les difficultés toutes particulières de la solution.

Il est très difficile, en effet, d'expérimenter d'une manière précise avec des substances aussi complexes, aussi mal définies, aussi instables que les toxines, les venins et les diastases des sucs digestifs.

Une série d'expériences préliminaires était donc nécessaire pour aborder cette question, et c'est le résultat de ces recherches que nous voulons ici brièvement rapporter.

Nous avons introduit la toxine tétanique ou le venin dans l'estomac des lapins, au moyen d'une sonde urétrale en gomme, bien huilée et glissée avec douceur dans l'œsophage, de façon à éviter la moindre éraillure, celle-ci pouvant entraîner la mort en permettant l'absorption du poison à ce niveau.

Pour plus de précautions, nous faisons couler un peu d'eau dans la sonde après l'introduction des toxines.

En opérant de la sorte, nous avons pu nous convaincre que l'ingestion de la toxine tétanique et celle du venin ne produit aucun accident chez les animaux, quelles que soient les doses ingérées. C'est ainsi que certains lapins ont pu ingérer, en une seule fois, des doses de toxine tétanique plus de 500 fois mortelles; d'autres ont absorbé, en 20 et 30 fois, des doses de la même toxine près de 1,000 fois mortelles. C'est ainsi que certains lapins ont ingéré, en 40 fois, une dose de venin 600 fois mortelle, et que d'autres ont absorbé, en une seule fois, des doses plus de 100 fois mortelles.

Aucun des animaux qui avaient absorbé la toxine tétanique ou le venin ne possédait l'immunité. Que l'ingestion ait eu lieu à petites doses répétées ou à doses massives uniques, les résultats étaient les mêmes. Nos observations à ce sujet ne confirment pas ce qu'avait vu Fraser (d'Édimbourg). Tous nos lapins mouraient en même temps que les témoins, après avoir reçu une même dose de venin sous la peau.

Mais, peut-être, le sérum de ces animaux possédait-il des propriétés antitoxiques?

Pour le savoir nous avons saigné les animaux qui avaient ingéré les toxines, 24 heures, 48 heures, 8 jours, 10 jours après la dernière ingestion. Nous avons fait des mélanges, *in vitro*, de la dose mortelle de toxine tétanique ou de venin avec des quantités variables (1, 2, 3, 5, 10 c. c.) de ce sérum, et nous avons injecté le tout à des animaux neufs.

Aucun des animaux qui avaient absorbé la toxine tétanique ou le venin ne possédait un sérum doué de propriétés antitoxiques, soit pour les sujets de même espèce (lapins), soit pour ceux d'espèces différentes (cobaye, souris blanche).

En résumé, les toxines ne sont nullement nocives pour les animaux qui les ingèrent; et cette ingestion ne donne aucune immunité et ne confère aucune propriété antitoxique au sérum.

D'où cela provient-il? Ces toxines traversent-elles l'intestin sans être absorbées? S'il en est ainsi, nous devons les retrouver intactes dans les fèces.

Or, après avoir fait ingérer à des lapins 20 c. c. de toxine tétanique ou 20 c. c. de venin, on lie le rectum.

Le lendemain, on sacrifie les animaux. On recueille le contenu du tractus gastro-intestinal; on le lave; on le filtre et on injecte le filtrat à des animaux neufs.

Dans ces conditions, aucun des animaux injectés n'est mort. Il n'y avait donc aucune trace de toxine libre dans le tube digestif.

C'est donc qu'elles ont été absorbées ou détruites.

Elles ne sauraient avoir été absorbées en nature, car alors elles auraient déterminé la mort des animaux.

Elles ont donc été fixées ou détruites.

Par quel mécanisme?

Est-ce une fixation d'ordre physico-chimique analogue à un phénomène de teinture? ou bien une fixation d'ordre chimique? ou bien encore une décomposition par une diastase ou un ferment figuré?

Pour tâcher d'élucider cette question, nous avons opéré *in vitro* à l'aide de liquides rappelant par leur composition celle des sucs digestifs.

Nous avons employé :

1^o Solution de ptyaline ainsi formée :

Ptyaline commerciale de Merck.....	0 gr. 50
Chlorure de sodium.....	à 0 gr. 50
Chlorure de potassium.....	
Eau.....	100 grammes.
Chloroforme.....	X gouttes.

2^o Une solution de pepsine suivant la formule :

Pepsine de Merck.....	5 grammes.
Acide chlorhydrique ou lactique.....	2 —
Chlorure de sodium.....	1 gramme.

Chlorure de potassium.....	1 gramme.
Eau.....	1 litre.
Chloroforme.....	XL gouttes.
3° Une solution de pancréatine de Merck :	
Pancréatine.....	0 gr. 50
Chlorure de sodium.....	ad 0 gr. 50
— de potassium.....	
Eau.....	400 grammes.
Chloroforme.....	X gouttes.
4° De la bile de bœuf recueillie aussi aseptiquement que possible à l'abattoir.	

Nous placions dans des verres la dose sûrement mortelle de la toxine tétanique ou de venin avec des quantités variables (10 c. c. ou 20 c. c.) de ces liquides.

Le tout était porté à l'étuve à 40° pendant 24 heures, en même temps qu'un tube de toxine témoin destiné à démontrer que le seul séjour à l'étuve ne suffisait pas pour atténuer celle-ci. Le lendemain, on pratiquait les injections.

Dans ces conditions :

1° La ptyaline détruit totalement l'activité de la toxine tétanique et du venin ;

2° Le suc gastrique artificiel que nous avons employé les modifie considérablement en les détruisant ou en les atténuant dans de très fortes proportions ;

3° La bile les atténue ou même les détruit, mais il faut pour cela une assez grande quantité de cette humeur.

4° La pancréatine atténue manifestement la toxine tétanique sans la détruire ; à haute dose elle peut la détruire. Elle détruit, au contraire, même à petites doses, l'activité du venin.

Pour étudier l'action des microorganismes intestinaux, nous avons procédé suivant deux méthodes : *in vivo* et *in vitro*.

a) Nous avons laparotomisé des lapins et lié une anse intestinale de 10 à 15 c. de long ; à travers la ligature supérieure et avant de serrer celle-ci, nous avons introduit dans l'anse, à l'aide d'une seringue de Pravaz, 0,5 c. c. de venin, c'est-à-dire plus que la dose mortelle. On refermait ensuite l'abdomen.

En même temps, on injectait sous la peau d'un témoin la même dose de venin.

Les animaux qui avaient reçu le venin dans l'intestin mouraient à peu près en même temps que les témoins.

Ceci prouve que ni l'épithélium intestinal, ni les microbes de l'intestin ne détruisent le venin.

Pour la toxine tétanique, on ne saurait procéder de la sorte, car il faudrait attendre au moins 48 heures avant que les accidents se déclarent et l'occlusion intestinale tuerait l'animal dans ce délai.

Nous avons donc opéré autrement. 24 heures après l'introduction de la toxine tétanique dans l'anse intestinale isolée, on ouvre de nouveau l'abdomen et l'on retire le liquide restant dans l'anse ligaturée. On filtre sur papier et on injecte aux animaux. Or ces derniers meurent, mais avec un léger retard sur les témoins, qui ont reçu la même dose de toxine pure filtrée sur papier.

Les toxines, après un séjour de 24 heures dans une anse intestinale liée, ne sont que légèrement altérées; elles peuvent n'être même nullement modifiées.

b) *In vitro*, en plaçant à l'étuve de la toxine tétanique ou du venin mélangés avec des matières fécales de lapin, on constate que, 24 heures après, la toxine tétanique possède une activité sensiblement atténuée; le venin a conservé au contraire presque complètement son pouvoir toxique.

Puisque, en somme, les microorganismes intestinaux ne font qu'atténuer légèrement l'activité des toxines, faut-il admettre que ce soit l'épithélium intestinal qui joue un rôle destructeur?

Sacrifions un lapin, recueillons aussi aseptiquement que possible une anse intestinale de 10 c. m. de long. Débarrassons-la des matières qu'elle renferme sous un léger courant de sérum artificiel chloroformé et tiède. Lions le bout inférieur. Plaçons dans cette anse 3 c. c. de toxine tétanique ou de solution à 1 0/0 de venin. Fermons au-dessus et plaçons l'anse ainsi préparée dans un tube contenant 10 c. c. d'eau distillée stérilisée et chloroformée. Dans ces conditions, l'intégrité des sucs cellulaires et des diastases est respectée aussi complètement que possible, car nous savons que le chloroforme, surtout à faible dose, n'exerce aucune action destructive sur eux. Mettons le tout à l'étuve à 40°.

Le lendemain, injectons à des animaux le liquide extérieur à l'anse et celui qui y est demeuré.

Nous constatons alors que les toxines ont dialysé, mais qu'en dialysant elles se sont atténuées d'une manière insignifiante.

L'épithélium intestinal ne détruit donc ni la toxine tétanique, ni le venin: il les atténue à peine.

Enfin, en admettant que les toxines traversent intégralement la muqueuse intestinale, les voilà dans le sang; que vont-elles devenir au contact des oxydases leucocytaires?

En suivant le procédé indiqué par Portier, nous avons obtenu des oxydases leucocytaires donnant au contact de la teinture de racine de gaïac la belle coloration bleue révélatrice.

Ces oxydases ont été placés *in vitro* à l'étuve à 40° avec la dose mortelle de venin et de toxine tétanique.

Le lendemain, les mélanges étaient injectés aux animaux.

Nous avons constaté de la sorte que les oxydases leucocytaires atténuent dans des proportions appréciables, mais sans les détruire complètement, la toxine tétanique et le venin.

Si, pour nous résumer, nous jetons les yeux sur le tableau suivant, nous voyons quelle est l'action respective des facteurs étudiés sur les toxines, et nous comprenons pourquoi ces toxines introduites par la voie gastrique sont inactives, pourquoi elles ne donnent pas l'immunité dans ces conditions, pourquoi enfin elles ne confèrent aucune propriété antitoxique au sérum des animaux qui les ingèrent.

AGENT ÉTUDIÉ	ACTION	
	TOXINE TÉTANIQUE	VENIN
Ptyaline.....	Atténuation considérable.	Atténuation très prononcée.
Suc gastrique....	— —	Destruct. presque complète.
Bile.....	— —	— —
Pancréatine.....	Destruction.	Destruction.
Microbes intestin..	Atténuation très légère.	Atténuation très légère.
Epithélium intes- tinal.....	Presque nulle.	Presque nulle.
Oxydases leucocyt.	Atténuation notable.	Atténuation notable.

DEUXIÈME PARTIE

DU SORT DES ANTITOXINES INTRODUITES DANS LE TUBE DIGESTIF.

Après l'étude que nous venons de faire relativement à deux types de toxines, l'une d'origine microbienne, l'autre d'origine animale, il importait de savoir si les antitoxines sont elles aussi modifiées ou détruites sous l'action des sucs digestifs, et si l'introduction de ces antitoxines dans le tube digestif est capable de conférer l'immunité.

Jusqu'à présent, très peu d'expérimentateurs se sont occupés de cette question. On a bien essayé d'administrer les sérums dans un but thérapeutique, soit par la voie gastrique (Ferran), soit par la voie rectale (Chantemesse); mais aucune étude expérimentale n'a été entreprise sur le sort des antitoxines introduites dans le tube digestif.

Seul Gibier, dans la note qu'il présenta en 1896 à l'Académie des sciences, affirma que « le sérum antitétanique introduit dans l'intestin des cobayes n'immunise point ces animaux », mais il n'en cherche pas la cause.

Nous avons donc abordé cette question en faisant usage des méthodes qui nous ont servi pour les toxines, et qui ont été précédemment décrites. Il va sans dire qu'elles sont justiciables des mêmes reproches, et que leur valeur n'est qu'approximative; nous les donnons pour ce qu'elles valent.

Et d'abord nous nous sommes aisément convaincus que l'injection de sérum antitétanique ou de sérum antivenimeux n'immunise pas les animaux contre le tétanos ou contre le venin des serpents. — Le résultat est toujours le même, quelles que soient les doses injectées (elles ont varié entre 60 c. c. et 250 c. c.). Ils ont aussi été identiques, que l'injection ait été unique et massive ou qu'elle ait été fractionnée et échelonnée en 1 à 2 mois.

Le sérum des animaux qui avaient ingéré les antitoxines ne possédait aucune propriété antitoxique, ni pour les animaux de même espèce, ni pour ceux d'espèces différentes.

Cependant les antitoxines ingérées ont été absorbées ou détruites, car si on introduit dans l'estomac des lapins, après avoir lié le rectum, 120 c. c. de sérum (antitétanique ou antivenimeux), on constate que 24 heures après il n'en reste plus dans le tube digestif.

Les antitoxines cependant n'ont point été absorbées en nature, puisqu'elles n'ont pas conféré l'immunité: elles ont donc été détruites ou modifiées. Mais par quel mécanisme?

Nous avons suivi ici exactement la même méthode expérimentale que pour les toxines et voici ce que nous avons observé:

1° La ptyaline ne modifie nullement l'activité des sérums antitoxiques.

2° Le suc gastrique artificiel employé ne la modifie pas non

plus. Seul, le sérum antivenimeux a perdu un peu de son activité.

3° La bile de bœuf ne possède aucune action modificatrice sur les antitoxines étudiées.

4° La pancréatine, au contraire, les modifie fortement ou même peut les détruire.

5° Placées pendant 24 heures dans une anse intestinale liée, elles perdent leur activité,

6° Les migro-organismes intestinaux leur font également perdre leur activité.

7° En pratiquant la même expérience que celle qui nous a servi pour étudier l'action de l'épithélium intestinal sur les toxines dans la première partie de ce travail, nous avons pu nous convaincre que ni dans l'anse intestinale liée, ni dans le liquide au milieu duquel cette anse était plongée, il ne restait de sérum antitoxique actif.

L'épithélium intestinal semble donc l'avoir détruit.

Enfin les sérums antitétaniques et antivenimeux ne sont point modifiés au contact des oxydases leucocytaires.

En résumant ces résultats en un seul tableau, on saisit rapidement l'action respective des divers facteurs étudiés.

FACTEURS ÉTUDIÉS	ACTION	
	SÉRUM ANTISEPTIQUE	SÉRUM ANTIVENIMEUX
Ptyaline.....	Presque nulle.	Nulle.
Suc gastrique.....	Nulle.	Presque nulle.
Bile.....	Presque nulle.	Presque nulle.
Pancréatine.....	Très notable.	Très notable.
Microbes intestin..	Très notable.	Très notable.
Epithélium intestinal	Destruction.	Destruction.
Oxydases leucocyt.	Nulle.	Nulle.

Bien que la complexité des substances (toxines et antitoxines) que nous avons étudiées dans ce travail soit considérable, nous pensons que les expériences ci-dessus relatées permettent de mieux comprendre pourquoi les toxines et les antitoxines introduites dans le tube digestif perdent leur activité.

Nous estimons cependant que l'étude de cette question appelle de nouvelles recherches:

ESSAI SUR L'EMPLOI DES MATIÈRES COLORANTES

POUR LA RECHERCHE DES EAUX D'INFILTRATION

PAR M. A. TRILLAT

L'emploi des matières colorantes et de la fluorescéine pour la recherche de l'origine des cours d'eau et de leurs relations n'est pas nouveau. Cependant, on peut être surpris que ce procédé se soit si peu généralisé.

J'ai pensé que cet état de choses pouvait provenir de l'ignorance des conditions dans lesquelles on devait se placer pour appliquer efficacement la méthode.

Une expertise ayant eu pour objet la recherche de l'origine d'une eau m'a fourni l'occasion d'étudier cette question ; je crois utile de publier le résultat de mes observations.

Les exemples relatés dans les diverses revues scientifiques concernant les recherches d'eaux effectuées au moyen des colorants sont peu nombreux.

Une remarquable expérience couronnée de succès fut tentée en 1877 par Kop pour établir la relation qui existait entre les eaux du lac de Constance et les deux fleuves voisins, le Rhin et le Danube. 10 kilos de fluorescéine furent jetés dans le Danube entre Mœhringen et Immendingen : après 60 heures, on vit la fluorescence apparaître dans l'Ach, l'un des affluents du lac : le phénomène dura 36 heures.

MM. Forel et Goliez rapportent des expériences tentées le 3 décembre 1892 pour rechercher les relations entre les eaux du lac Brenet et la source de l'Orbe. 1 kilog. de violet d'aniline, dissous dans l'eau acidifiée par de l'acide acétique, fut jeté dans l'entonnoir de Boussort : une surveillance attentive fut établie à la source de l'Orbe ; le débit de l'entonnoir était de 200 litres par seconde ; celui de l'Orbe de 2,000 litres. Aucune coloration ne put être constatée.

La même expérience fut répétée par M. Paccard, en remplaçant le violet d'aniline par la fluorescéine ; il jeta la solution colo-

rante dans les entonnoirs de Boussart : les premiers phénomènes de coloration parurent 50 heures après dans la rivière de l'Orbe dont l'origine put être ainsi définitivement établie.

Après ces exemples, et d'autres que je pourrais citer, je crois intéressant de signaler le résultat de l'expérience suivante.

La municipalité d'une ville importante des environs de Paris avait fait construire une galerie filtrante juxtaposée pour ainsi dire le long de la Seine. Au moyen d'une pompe élévatoire, l'eau filtrée était distribuée dans la ville.

Or l'analyse chimique de deux prélèvements d'eau, l'un effectué chez l'habitant, l'autre en pleine Seine, démontra que la composition des deux échantillons était différente. Les prélèvements faits dans divers points de la ville confirmèrent les premiers résultats : cette eau se distinguait de l'eau de Seine par un degré hydrométrique beaucoup plus élevé. Il s'éleva à ce propos un procès curieux entre les habitants, d'une part, et la municipalité qui s'était engagée à fournir de l'eau de Seine filtrée.

A ce sujet, les suppositions les plus invraisemblables surgirent, notamment celle de la désagrégation des matériaux de la galerie filtrante.

Désigné comme expert pour étudier cette question, après avoir constaté la différence de composition chimique entre les deux eaux, je parvins à identifier partiellement l'eau prélevée chez l'habitant avec l'eau d'une source située à environ 600 mètres de la galerie filtrante. Une vive polémique s'étant engagée, je tentai de démontrer d'une manière plus palpable la relation qui existait entre les eaux de la source et l'eau distribuée en ville.

Une solution ammoniacale de 100 gr. de fluorescéine fut jetée en une seule fois dans un puits communiquant avec la source. Quelques heures après, je commençai à prélever des échantillons d'eau en ville, que je comparai avec le prélèvement type effectué avant l'addition de fluorescéine. Au moyen du *fluorescope* décrit plus loin, je parvins à distinguer après 10 heures la fluorescence de l'eau, parfaitement invisible à l'œil nu à ce moment. Elle ne devint apparente en ville qu'après 24 heures.

Je pus donc ainsi démontrer que la galerie filtrante avait été construite sur une nappe d'eau souterraine, et qu'elle ne recueillait en grande partie que l'eau calcaire de la source, quoi-

qu'elle ne fût placée qu'à une dizaine de mètres de la Seine.

A côté de ces essais effectués avec la fluorescéine, on peut citer un certain nombre d'expériences tentées avec de la fuchsine, et dont la plupart donnèrent des résultats négatifs, ce qui n'a pas lieu d'étonner, la fuchsine étant, comme on le verra plus loin, facilement décolorée par les eaux calcaires.

Il était à supposer que la nature de l'eau soumise aux expériences ou que la filtration des solutions colorées à travers des terrains sablonneux, argileux, calcaires ou tourbeux pouvaient avoir comme résultat de décolorer partiellement ou même totalement certaines couleurs.

Il était surtout important d'examiner l'action des matières ammoniacales sur les solutions colorées, de manière à savoir si le procédé était applicable à la recherche des infiltrations des fosses.

Pour élucider ces questions, j'ai d'abord déterminé la valeur comparative des principaux colorants dans l'eau distillée et dans diverses eaux. J'ai ensuite examiné l'influence de la nature des sols et des produits ammoniacaux sur les solutions colorées. Enfin, j'ai cherché quel pourrait être le meilleur mode d'emploi des matières colorantes, au moyen d'un dispositif spécial.

INFLUENCE DES EAUX

Les matières colorantes expérimentées sont les suivantes : auramine, safranine, rouge congo, fuchsine neutre, éosine, vert malachite, violet de Paris, bleu méthylène et fluorescéine. Comme couleur acide, j'ai choisi la fuchsine sulfonée.

Pour déterminer proportionnellement l'intensité de coloration dans l'eau distillée, elles ont été préalablement purifiées et séchées plusieurs jours à une température de 90°. Les observations ont été faites sur un litre d'eau, dans des flacons en verre blanc de 7 centimètres de diamètre intérieur.

Les dissolutions colorées au 1/100000 sont encore intenses. A la dose de 1/1000000, elles sont toutes plus ou moins appréciables, mais à une dilution 50 fois plus faible, soit à la dilution de 1/50000000, l'éosine, l'auramine et la fuchsine acide deviennent invisibles. Les autres couleurs, à part la fluorescéine, deviennent difficilement appréciables. On peut les disposer ainsi, par ordre décroissant d'intensité pour cette dose de

1/5000000 : fluorescéine, vert malachite, bleu méthylène, violet, fuchsine neutre, safranine, rouge congo.

Si l'on remplace l'eau distillée par de l'eau marquant 45° hydrométriques, on peut observer que les solutions au 1/1000000 sont encore visibles après 24 heures, mais avec une eau marquant 40° et riche en carbonates, la décoloration est totale pour les couleurs suivantes : auramine, fuchsine acide et neutre, vert malachite et violet; elle est atténuée, mais encore visible pour le rouge congo, l'éosine. Enfin la safranine et le bleu de méthylène ont été les couleurs les moins influencées par la présence des sels calcaires en dissolution dans l'eau. La fluorescéine perd un peu de sa fluorescence : cela peut être attribué à un léger précipité formé dans l'eau.

J'ai constaté que si l'observation de la fluorescence a lieu dans une eau contenant des matériaux en suspension ou même dans une eau très légèrement trouble, le dichroïsme devient difficilement décelable. Il est donc nécessaire, dans ce cas, de filtrer l'eau afin d'avoir un liquide clair et transparent.

On peut donc conclure que la plupart des matières colorantes sont précipitées en bases par les sels calcaires des eaux.

INFLUENCE DES TERRAINS

Il peut arriver que les eaux sur lesquelles on doit expérimenter filtrent à travers des sols de natures diverses. On peut se demander dès lors si les solutions colorées seront modifiées ou arrêtées et si on pourrait régénérer leur coloration.

Pour étudier cette question, j'ai préparé des solutions de matières colorantes au 1/1000000, et je les ai filtrées à travers des couches de sols de composition différente. La couche dont la composition correspondait à la nature du sol à étudier était placée dans une allonge, de manière à former une épaisseur de 30 centimètres; la solution colorée était ajoutée goutte à goutte et recueillie après la filtration.

J'ai expérimenté des sols calcaires, sablonneux, argileux et tourbeux, correspondant à la composition centésimale suivante :

	Matière organique.	Argile.	Carbonate.
Sol calcaire.....	0	6.090	73.80
Sol argileux.....	7.94	79.20	
Sol tourbeux.....	49.07	35 »	
Sol sablonneux.....	4.56	0	

Le sol calcaire a décoloré entièrement toutes les solutions, sauf la fluorescéine. Les solutions filtrées restent incolores par une addition d'acide acétique, excepté la fuchsine acide, dont la coloration rouge réapparaît.

Les sols argileux et sablonneux laissent passer les solutions colorées, mais dans un état plus ou moins affaibli.

Le sol tourbeux a décoloré toutes les dissolutions, y compris celle de la fluorescéine. La fuchsine acide, comme dans le cas précédent, a pu cependant être régénérée.

Des résultats analogues ont été obtenus en filtrant les solutions colorées à travers des couches de terre de jardin légère et de terre arable.

Les matières colorantes sont donc précipitées en base incolore par les sels calcaires, et la base précipitée se trouve arrêtée dans le sol : la fuchsine acide (il doit en être de même des autres couleurs sulfonées) est décolorée et transformée en base soluble qui n'est pas arrêtée. Il en résulte que, pour ce dernier cas, l'addition d'acide acétique régénère la coloration.

Je me suis servi du même procédé pour me rendre compte de l'action de l'ammoniaque libre et des sels ammoniacaux. Pour cela, j'ai utilisé le fumier de ferme, qui a été disposé en couches de 40 centimètres de hauteur. Les résultats sont analogues aux précédents : la fuchsine acide a pu être régénérée et la fluorescéine a pu être décelée facilement, après avoir eu soin de clarifier le liquide. — Le tableau de la page 449 résume les résultats observés.

L'intensité de coloration des solutions varie donc beaucoup, non seulement selon les eaux, mais surtout selon la nature des sols.

En me basant sur la propriété que possède la fluorescéine, d'être rendue plus visible lorsqu'on observe sa solution contre une surface noire, j'ai imaginé un dispositif qui permet de la reconnaître à des doses infiniment faibles. L'appareil se compose de deux tubes en verre blanc disposés verticalement et à la même hauteur le long d'un support, au moyen de deux pinces. Ils ont une longueur de 1^m,20, sur une largeur de 2 centimètres, et sont ouverts à la partie supérieure, tandis que la partie inférieure est fermée par un bouchon dont la face interne a été préalablement passée au vernis noir. Plus simplement, on

TABLEAU DES ESSAIS

MATIÈRES COLORANTES EMPLOYÉES :

FLUORESCÉINE, VERT MALACHITE, BLEU MÉTHYLENE, VIOLET DE PARIS, SAFRANINE,
FUCHSINE NEUTRE, FUCHSINE ACIDE, ÉOSINE, ROUGE CONGO, AURAMINE

DILUTION des COLORANTS	EAU DISTILLÉE ET EAU à 45° hydrotim.	EAU A 40° HYDROTIM.	SOL CALCAIRE	SOL ARGILEUX ET SABLONNEUX	SOL TOURBEUX	FUMIER DE FERME	TERRE ARABLE et TERRE DE JARDIN
Millionième.	Visibles.	Après 24 heures, fluorescence très visible. Décoloration totale pour auramine, fuchsine neutre et acide, vert malachite. Décoloration partielle pour safranine, rouge Congo, éosine.	La fuchsine acide est régénérée par addition d'acide acétique.	Atténuation de coloration dans toutes les solutions.	Décoloration totale pour toutes les matières colorantes y compris fluorescéine. Par acidification, régénération de la fuchsine acide.	Fluorescence nettement appréciable, mais après clarification de liquide filtré. La fuchsine acide peut être régénérée par acidification. Décoloration totale pour toutes les autres matières colorantes.	Résultats semblables à ceux donnés sur le sol calcaire.
Dix-millionième.	Visible.						
Cinquante-millionième.	Fluorescéine visible. Les autres couleurs très atténuées par ordre décroissant: vert malachite, bleu violet, fuchsine neutre, safranine, rouge Congo. Éosine, auramine et fuchsine acide invisibles.						
Cent-millionième.	Invisible sauf fluorescéine.						
Cinq cent-millionième.	Id.						
Deux-milliardième.	Fluorescence visible seulement au fluoroscope.						

peut disposer sur cette face un petit disque de papier noir glacé.

Si l'on remplit ces deux tubes jusqu'à un centimètre du bord, l'un avec de l'eau naturelle, l'autre avec cette même eau contenant des traces de fluorescéine, on peut observer, en plaçant

l'œil dans l'axe de chaque tube, que l'eau naturelle se projette suivant une couleur bleu sombre, tandis que l'autre a une teinte vert clair. Cette différence se manifeste pour une solution dont la fluorescéine n'est plus visible à l'œil sans cet appareil.

La limite de la visibilité de la fluorescéine étant environ de $1/200000000$, le fluorescope permet de décupler cette visibilité en sorte qu'elle peut être évaluée à $1/200000000$, soit 1 gramme de fluorescéine dans 2 mille mètres cubes d'eau.

On peut donc tirer profit de l'emploi de cet appareil dans le cas où la fluorescéine aurait été invisible à l'œil nu. Il permet en outre de reconnaître la fluorescence longtemps avant la visibilité normale : il pourra ainsi donner des renseignements plus exacts sur la vitesse du débit des eaux.

Dans l'application de la méthode, on pourra suivre la marche suivante. La fluorescéine sera dissoute dans l'alcool additionné d'un peu d'ammoniaque : quant à la quantité à employer, elle peut être variable selon les circonstances, et il est difficile de fixer une limite à ce sujet.

Un prélèvement de l'eau à examiner sera effectué avant l'addition de la fluorescéine, et le liquide sera placé dans l'un des deux tubes de l'appareil. Après l'addition de la matière colorante et après un premier laps de temps variant suivant les distances, de nouveaux prélèvements seront faits toutes les deux heures, par exemple, et examinés comparativement au prélèvement type.

Voici comment on pourrait résumer les résultats que j'ai obtenus dans mes expériences :

(a) Les matières colorantes autres que les couleurs sulfoconjuguées, telles que la fuchsine acide et la fluorescéine, sont à rejeter.

(b) Avant l'addition de la matière colorante, il sera nécessaire de déterminer la nature du terrain : j'ai démontré plus haut qu'elle avait une grande influence sur l'intensité de la coloration qui peut même devenir nulle dans certains cas.

(c) Il est impossible de donner une indication précise sur la quantité de fluorescéine ou de fuchsine acide à employer : elle est subordonnée à l'importance des cours d'eau, de la composition des terrains, des nappes souterraines, de la distance à franchir, etc. La dose de 100 grammes de fluorescéine peut déjà

donner des résultats dans beaucoup de cas, comme dans l'exemple que j'ai relaté ; la dose de 1 kilo est énorme, car elle peut être, par l'emploi du fluorescope, décelée dans la dilution d'environ deux millions de mètres cubes.

(d) La fluorescéine sera dissoute dans de l'alcool additionné d'environ 5 0/0 d'ammoniaque.

(e) Les eaux de vidanges, le passage à travers des fosses ou du fumier, atténue la fluorescence : la fuchsine acide est momentanément décolorée, mais sa couleur réapparaît par addition d'acide acétique. Il s'ensuit que son usage peut être utilisé dans ces cas, même conjointement avec celui de la fluorescéine.

USAGES

Outre la recherche de l'origine des sources, on peut se servir des solutions des colorants pour établir les relations entre deux cours d'eau ou entre des lacs, pour l'étude des glaciers et, en général, pour les études géologiques.

Étant donné la quantité de fluorescéine employée, le temps nécessaire pour apercevoir au fluorescope la première fluorescence, le moment où la fluorescence devient la plus intense et la durée du phénomène, on peut avoir, sinon une idée exacte, du moins la notion du volume d'une source, de sa vitesse, de l'existence et de l'importance des nappes d'eau souterraines.

Dans l'hygiène, on peut s'en servir pour reconnaître, comme cela a déjà été fait, les fuites d'eau dans les canalisations douteuses, et *vice versa*, pour reconnaître dans ces mêmes canalisations les infiltrations extérieures. En temps de contamination, l'emploi combiné de la fluorescéine et de la fuchsine sulfonée, dont les propriétés colorantes, ainsi que je viens de le démontrer, ne sont pas entièrement détruites par les matériaux de la décomposition, pourra rendre les plus grands services pour découvrir les infiltrations et les suintements provenant des fosses des maisons ou des quartiers conglomérés.

Dans l'industrie, on pourrait souvent avoir recours aux colorants pour les questions, si controversées par les intéressés, des infiltrations des eaux résiduaires provenant des établissements classés.

FERMENTATION DES FIGES DE BARBARIE

PAR E. ROLANTS

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille.

Le figuier d'Inde ou de Barbarie (*Cactus opuntia*) est très abondant dans la zone méridionale de l'Europe et dans les pays barbaresques. On le trouve aussi en grandes quantités au Mexique. A cause des épines nombreuses qui garnissent ses tiges, il sert surtout à former des haies dans ces pays. Il peut se cultiver avec la plus grande facilité. Le travail que nécessite son entretien est insignifiant. Ses fruits contiennent une assez forte proportion de sucre fermentescible. On peut donc se demander pourquoi, malgré l'avis de nombreux auteurs, on n'en retire pas encore l'alcool qu'ils seraient capables de fournir; d'autant plus qu'après distillation, ces fruits laissent un résidu qui est très susceptible d'être employé pour l'alimentation du bétail.

Le seul travail que nous connaissions sur la fige de Barbarie a été publié, en 1876, par M. Balland, alors pharmacien militaire en Algérie¹. Cet auteur relate d'abord 3 essais de fermentations faites en laissant agir sur le suc les espèces de levures qui se trouvent naturellement sur les fruits.

Dans le 1^{er} essai, il abandonna à la fermentation 11 kilos de suc obtenu par pression de 33 kilos de fruits (soit 33 0/0). Ce suc contenait 128 grammes de sucre réducteur par litre et, après fermentation complète du sucre, 4,2 d'alcool pour 100 parties de suc. L'acidité s'accrut de façon considérable: de 2 gr. 8 par litre (en ac. sulfurique) avant fermentation, elle monta à 7 gr. 8 après fermentation.

Dans le 2^e essai, 21 kilos de figes donnèrent 10 kilos de suc (soit 48 0/0). Le suc contenait 145 grammes de sucre réducteur par litre et après fermentation 4,2 d'alcool pour 100 parties de suc. L'acidité arriva de même à 8 gr. 4 par litre.

Dans le dernier essai 6 kil. 8 de figes lui donnèrent 4 kil. 1 de suc (soit 60 0/0). Les 140 grammes de sucre réducteur par

1. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1876.

litre donnèrent 45 c. c. d'alcool. L'acidité alla aussi de 1 gr. 4 à 8 gr. 5 par litre.

Cette augmentation considérable de l'acidité est, sans aucun doute, l'œuvre des nombreuses espèces de bactéries qui envahissent ces suc. Certaines de ces bactéries produisent aux dépens du sucre une fermentation mannitique qui influe très fortement sur le rendement. Pour les combattre, M. Balland a essayé d'ajouter au suc une faible quantité de tannin, d'acide sulfurique ou d'acide chlorhydrique. C'est avec ce dernier, à la dose de 5 grammes par litre, qu'il obtint les meilleurs résultats. Le rendement pouvait être établi de la façon suivante : 1,000 litres de suc fermenté, provenant de 1,500 kilos de figes, donnent 70 à 75 litres d'alcool à 85°, ou 59 à 64 litres d'alcool à 100°, soit 39 à 43 litres d'alcool à 100° pour 100 kilos de fruits.

M. Lebon, ancien ministre des Colonies, et M. Vivier de Steel, ont bien voulu adresser à notre Institut une petite quantité de figes provenant d'Algérie, en nous priant de reprendre cette étude.

La composition des figes de Barbarie est très variable suivant la maturité et surtout suivant les espèces. Les fruits que nous avons reçus étaient relativement pauvres en sucre. Voici la moyenne de plusieurs analyses pour 100 grammes :

Eau.....	84,65
Sucre interverti.....	10,00
Acidité (en ac. sulfurique).....	0,036
Cendres.....	1,057
Matières pectiques.....	1,573
Matières extractives.....	2,614

Il n'y a pas d'amidon ni aucune substance capable d'être saccharifiée par les acides. L'acidité très faible est due à la présence de traces d'acide acétique et d'un acide fixe que nous n'avons pas déterminé.

Le principal inconvénient que présente l'emploi de ces fruits est la présence de ces matières pectiques, qui oblitèrent complètement les filtres et rendent l'obtention de liquides clairs très difficile. On peut les insolubiliser en portant le suc 20 minutes à 120°, la pression et la filtration deviennent alors faciles. L'ébullition permettrait vraisemblablement d'atteindre le même but.

Nous avons essayé d'extraire le suc par pression, mais les matières pectiques en retenant une telle quantité que, pour éviter de trop grandes pertes, nous avons préféré délayer, après pressage, la pulpe avec de l'eau, de façon à obtenir, en liquide, le poids des fruits employés. Après stérilisation, puis filtration du liquide obtenu, nous avons mis en fermentation avec

- 1° La levure Logos de M. Van Laer ;
- 2° Une levure de vin d'Espagne ;
- 3° Une mycoleuvre trouvée sur ces figes.

Après 9 jours de fermentation nous avons obtenu pour 100 parties de fruits.

	TÉMOIN NON FERMENTÉ	N° 1. LEVURE LOGOS	N° 2. LEVURE D'ESPAGNE	N° 3. MYCOLEVURE DE FIGES
Densité.....	1,0380	1,0019	1,0019	1,0260
Sucre (en glucose).....	9,43	0,50	0,50	6,41
Alcool.....	—	4,14	4,15	0,88
Acidité (en acide sulfuriq.)..	0,047	0,12	0,13	0,10

Le rendement est donc de 41 lit. 5 d'alcool à 100° pour 1,000 kilos de fruits.

Une autre expérience faite dans les mêmes conditions avec

- 1° Une levure de vin de Champagne ;
- 2° Une levure apiculée de vin de Champagne ;
- 3° Une levure de distillerie de grains, . . .

a donné après sept jours de fermentation.

	TÉMOIN NON FERMENTÉ	N° 1. LEVURE DE CHAMPAGNE	N° 2. LEVURE APICULÉE DE CHAMPAGNE	N° 3. LEVURE DE DISTILLERIE DE GRAINS
Densité.....	1,0400	1,0100	1,0130	1,0100
Sucre (en glucose).....	9,46	0,687	1,221	0,737
Alcool.....	—	4,15	3,8	4,10
Acidité (en acide sulfuriq.)..	0,015	0,16	0,19	0,18

Le rendement est analogue au précédent.

Les figues de Barbarie contiennent en général plus de sucre fermentescible que les fruits que nous avons employés. M. Balland a étudié des sucres contenant jusqu'à 14 gr. 5 de sucre pour 100 grammes de fruits; on nous a même assuré que certaines espèces du Mexique étaient encore plus riches.

Nous croyons donc qu'il serait avantageux de cultiver le figuier de Barbarie, du moins les espèces donnant des fruits contenant une grande proportion de sucre. On pourra découper les fruits en cossettes avec des appareils analogues à ceux qui servent en sucrerie pour la betterave, ou pour la fabrication du cidre de pomme en Normandie, en extraire le suc par pression, et reprendre le marc avec une certaine quantité d'eau, de façon à avoir en volume le poids des fruits employés. On fera bouillir le liquide ainsi obtenu et on l'ensemencera avec une levure pure, de préférence en cuves métalliques fermées, qui permettent un travail antiseptique.

L'alcool fourni par les figues de Barbarie est de très bonne qualité. Il renferme, à l'état de flegmes, des éthers aromatiques à odeur agréable, qu'il est, du reste, facile de séparer par rectification.

En résumé, nous pensons que :

1° Les figues de Barbarie peuvent être employées avec avantage industriellement à la fabrication de l'alcool;

2° Qu'elles peuvent fournir un rendement de 40 à 60 litres d'alcool à 100° pour 1,000 kilos de fruits, suivant la richesse de ces fruits en sucre fermentescible;

3° Que la culture du figuier de Barbarie dans un terrain *inapte à toute autre exploitation* peut être rémunératrice. Si nous en croyons le Dr de Vera y Lopez¹, cette culture est très productive. Un figuier peut fournir de 100 à 200 kilos de fruits par an; on peut cultiver 90 pieds par hectare, ce qui permet d'obtenir une récolte de 9 à 18,000 kilos de fruits, pouvant donner de 360 à 720 litres d'alcool à 100°. Le chiffre de 360 étant donné pour les espèces à rejeter, on peut donc dire que l'hectare produirait facilement de 540 à 720 litres d'alcool à 100°.

1. *Tratado de fabricacion de aguardientes y alcoholes*, Madrid, 1885.

LES CHLOROPHYLLES

ET LES CHLOROPHYLLES DE FOUGÈRES

PAR M. ÉTARD

Si les pigments chlorophylliens sont encore l'objet de discussions obscures et si beaucoup de savants persistent à admettre une seule chlorophylle pour tous les végétaux, cela tient assurément au nombre trop restreint des analyses et des données spectrales qui ont été publiées.

Non seulement il existe plus d'une chlorophylle dans la nature, mais souvent il en existe plusieurs dans une même plante, comme je le montrerai plus loin. Le nombre des chlorophylles est bien plus grand que celui des espèces botaniques, car dans chacune d'elles les chlorophylles sont affectées aux travaux nécessaires à la plante, à la synthèse des nombreux matériaux que nous lui voyons produire.

Avant de donner les preuves expérimentales qui se trouveront plus loin, qu'il me soit permis de dire comment je comprends le rôle de ces chlorophylles, afin de rendre par la suite plus compréhensible un travail analytique exposé, sans cela, à paraître dépourvu de cohésion.

A l'origine, dans la graine, existe le germe, né avec ses cotylédons dans un ovaire saturé de chlorophylles et ayant pu par ce contact en emporter une parcelle élémentaire. Cet embryon, de nature protoplasmique lors de la germination, ne montre pas de chlorophylles visibles, mais possède cependant le pouvoir d'évoluer, de solubiliser les amyloïdes, les acides gras et les albumines des cotylédons pour les insolubiliser sous d'autres formes dans la plantule.

Fut-il préexistant et latent, le grain chlorophyllien ne joue en fait un rôle certain qu'après l'accomplissement des importants travaux de la germination. Belzung¹ a d'ailleurs montré,

1. BELZUNG, Phénomènes amylochlorophylliens, *Journal de Botanique*, 1895.

par ses études de cytologie, que le grain chlorophyllien procède de la masse protoplasmique. Dans les végétaux, exactement comme dans les animaux, la puissance de mutation chimique peut donc résider dans le protoplasme dépourvu de chlorophylles apparentes. D'ailleurs les ferments, les champignons et les parasites tels que les cuscutes et même les orobanches ne laissent aucun doute à cet égard. Il y a lieu de rappeler seulement que le germe des plantes vertes vit de la même façon à ses débuts. Ce que le protoplasme ne fait pas seul chez les végétaux supérieurs, c'est la synthèse chimique, l'accumulation de la matière organique destinée à nourrir les animaux. Un germe primitif très petit, à éléments protoplasmiques, préside donc avant les chlorophylles à l'évolution. Il procède d'un ascendant exactement semblable qui a déposé en lui toutes les consignes héréditaires de morphologie, de choix d'habitat, de durée et de méthodes chimiques. Ces parcelles spécifiques se succèdent, comme le voulait l'ancienne théorie de l'emboîtement des germes rajeunie et désignée sous le nom de théorie de Weissmann.

Si les chlorophylles ne jouent pas de rôle au début de la vie, il ne paraît pas douteux qu'une trace de la matière qui doit les former en se trouve parmi les fonctions latentes du germe où toute la vie future est prévue et condensée.

Quoi qu'il en soit, les corps chlorophylliens apparaîtront à leur temps quand les réserves seront épuisées pour assurer la vie autonome. Chaque cellule est alors formée de deux éléments. Le protoplasma, le plus ancien représentant de la vie, travaille à la façon des cellules incolores. Le grain chlorophyllien est une algue venue postérieurement jouer le rôle de glande respiratoire par son action opto-chimique sur l'acide carbonique. L'ensemble de la cellule vit sous le régime symbiotique à la façon des lichens.

À première vue, le protoplasma qui conserve ses propriétés comme s'il était seul, et le grain chlorophyllien bien délimité comme un corps étranger dans la cellule, n'ont pas d'interaction compréhensible. Ils en ont cependant par suite de la variété des instruments chlorophylliens.

D'après les idées en cours, la « chlorophylle » fixe $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ en éliminant O_2 ; elle retient donc $(\text{CH}^2\text{O})^n$, et déverse dans le suc

cellulaire les sucres ainsi créés, bons à servir dans tous les actes chimiques de la plante.

Cette théorie simple ne tient pas compte entre autres choses de ce fait que le grain chlorophyllien est dans son ensemble l'élément *gras* de la cellule, et que la « chlorophylle » a toujours été décrite comme une matière cireuse ou graisseuse, en tout cas *insoluble* dans les milieux aqueux. Comment cette graisse absorberait-elle de l'eau et CO^2 pour faire, en passant par le formol, du sucre s'écoulant à l'état de solution aqueuse ?

Le germe contenant toutes les règles de l'évolution, et capable de reproduire les espèces que faisait la plante mère, contient aussi les embryons des molécules chimiques, leurs noyaux fondamentaux et la loi de leurs dédoublements.

Ces types moléculaires de la première heure se multiplient avec les matériaux très concentrés de la graine qui, liquéfiés d'abord, se précipitent sur eux par coagulation, ou par un phénomène comparable à l'accroissement des cristaux qui, dans un milieu complexe, n'attirent à eux que des molécules de leur propre symétrie. Dans les théories de synthèse les plus connues, trois corps simples seulement retiennent l'attention : $\text{C} + \text{O} + 2\text{H}$: il semble que Az, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Cu, Si, Na ne viennent qu'ensuite par surcroît. Il est impossible en fait d'avoir des graines exemptes de ces corps, et le germe ne parcourra jamais le cycle qui doit le reproduire un jour si le sol a été privé artificiellement des éléments chimiques, peu abondants mais nullement secondaires, cités plus haut.

Les théories sur la synthèse de combinaisons ternaires ne conduisent, par des hypothèses, qu'à des réactions finales, et comme sur ce terrain hypothétique c'est un progrès de faire intervenir *tous* les agents dont la nécessité est démontrée, mieux vaut en élargir la base.

A ce point de vue, il faut surtout retenir la basicité forte des radicaux albuminoïdes, c'est-à-dire protoplasmiques, et la coagulation ou précipitation de ces substances les unes par les autres¹. Dès que l'ébranlement germinatif se produit, les matériaux quaternaires (C, H, O, Az,) et même plus complexes (C, H, O, Az, P, S, K...) solubilisés un instant, se déposent sur les

1. DRECHSEL, *Berichte*, t. XXIII, 3096. KOSSEL, *Zeitchr. fur physiol. Chem.* t. XXII et XXV.

matériaux qu'on pourrait appeler *biomorphiques* du germe. Quittant la vie statique de graine en repos, la plante reprend son état dynamique. Il n'y a jusqu'à présent que le déplacement connu de tout temps de la même matière; je m'efforce seulement de l'expliquer à un autre point de vue. Si la plante cultivée dans un sol artificiel ne trouve pas les éléments P, Az, K, S, Cl..... elle n'atteindra qu'un poids très limité et l'on pourrait presque compter dans quel espace se trouvent répartis les atomes contenus dans la graine originelle ou combien d'atomes (P, Az, K, S, Cl.....) il y a par cellule.

Si le sol fait son apport normal de corps simples et dans ce cas seulement on peut essayer de raisonner sur la synthèse ternaire (C, H, O). Celle-ci s'accomplit surtout dans le grain chlorophyllien. Il est bien fâcheux que les travaux d'anatomie du grain en question aient tenté si peu de chercheurs. Autant qu'on peut se le représenter, cet organe-algue fonctionne comme une sorte de glande en grappe ayant des éléments protoplasmiques propres, en relation avec ceux de la cellule, au moins par le suc cellulaire qui sert de milieu commun.

La minime quantité de matière verte, son énorme pouvoir colorant que j'ai pu constater au delà du $\frac{1}{4,000,000}$ comparé à la masse des corpuscules verts, peu colorés individuellement, montre que bien peu de molécules chlorophylliennes relativement assurent le travail opto-chimique des plantes. Il paraît difficile de savoir comment se trouve répartie la matière verte. Ce que j'ai bien vu, c'est que divers dissolvants sont nécessaires pour décolorer le corpuscule-algue et le réduire à son squelette protoplasmique incolore. En même temps, sous le microscope, on voit par l'action des dissolvants sortir du grain qui se dégonfle une forte quantité de matières provoquant dans le liquide retenu sous la lamelle des stries d'inégale densité. Par cette observation on reconnaît directement que le grain vert est le siège de la formation des graisses, cires, carbures.

Les analyses de cendres faites par Hoppe-Seyler et M. A. Gautier sur la chlorophylle qu'ils ont préparée montre la présence d'éléments minéraux variés dans cet organe chimique de synthèse.

Dans les chlorophylles les plus pures que j'ai obtenues, et même après dissolution dans l'éther et le pentane secs, on trouve

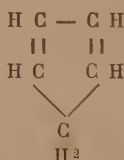
selon les espèces P, K, Cl, S, Fe, et très probablement Al et Cu. Cela fait légitimement penser que, même en se limitant à la synthèse ternaire, les molécules chimiques de chlorophylles utilisent à tout instant ces éléments.

M. G. Bertrand a montré récemment que de minimes quantités de sels organiques de manganèse, métal fréquent dans les plantes, jouent spécialement le rôle d'agents oxydants vis-à-vis des combinaisons du carbone.

L'algue chlorophyllienne sortie du protoplasma est dans son genre semblable à une hématie; elle fixe le carbone mais prend, transporte, cède et libère l'oxygène sans que rien indique une formation nécessaire d'aldéhyde formique.

Le protoplasma blanc ou pigmenté a les racines basiques des albumines vues par Kossel. Il peut fort bien introduire l'acide carbonique dans ses molécules par carbonatation directe sur l'azote et transformation ultérieure. Mais sans rechercher le rôle des éléments autres que C, H, O, il me paraît utile de dire que de simples carbures C, H, ou des poly-alcools peuvent fixer, au moins quand ils sont fortement *lacunaires*, divers éléments.

Le cyclopentadiène (A. ETARD et P. LAMBERT, *Compt. rend.*, t. CXII, p. 945) a pour formule C^5H^6 et a été représenté depuis par la formule développée



Ce carbure agité avec une solution de SO^2 donne un corps $C^{10}H^{16}O^6S^2$ cristallisé, blanc, infusible, non volatil. Il se polymérise à partir du moment où il a été distillé et devient $C^{10}H^{12}$.

L'œnocarpol de vigne, $C^{26}H^{37}(\text{OH})^3 + \text{H}^2\text{O}$ fixe directement KOH et rend des cristaux de $C^{26}H^{37}(\text{OH})^3\text{KOH}$. H^2O assimilable à un pentaalcool par sa stabilité (A. ETARD, *C. R.*, t. CXIV).

Ces deux faits entre autres mettent en évidence l'action de S et de K sur les lacunes chimiques.

Quel que soit pour les chlorophylles le mécanisme de fixation des mailles CH, OH, COH... par une sorte de plastification biomorphe, il n'en reste pas moins à expliquer comment la

« chlorophylle » insoluble et cireuse est à la fois en communication avec les milieux aqueux d'une part, et avec les huiles, cires, résines, carbures... dont peu de végétaux semblent exempts.

Ce rôle est contradictoire mais il ne l'est que par suite de l'hypothèse de la « chlorophylle » unique, et Pringsheim, agitant la question de savoir si cette matière était réellement unique, admettait qu'elle pouvait être dissoute dans un corps gras (c'était le lipochlore). L'historique de cette question est résumé dans le livre de Tschirch (*Untersuchungen uber das Chlorophyll*. P. Parey, Berlin, 1884). M. A. Gautier le premier a obtenu par voie chimique des différences dans l'analyse de deux chlorophylles extraites de deux espèces différentes. Tous les auteurs ont cependant continué à écrire sur la « chlorophylle » unique.

L'argument le plus sûr, utilisé pour conclure à une chlorophylle unique, consiste à dire que toutes les feuilles *vivantes* observées ont le même spectre (Tschirch). Cela est exact.

Mais deux chlorophylles identiques par leurs propriétés et leur analyse n'ont jamais été préparées dans deux laboratoires différents, agissant par leurs méthodes particulières.

	A. GAUTIER <i>Cristaux.</i>	ROGALSKY	HOPPE SEYLER <i>Chlorophyllane.</i>	MOROT	PFAUNDLER
C	73.97	73.20-73.83	73.4	69.23	60.84
H	9.80	40.50-40.25	9.7	6.40	6.38
Az	4.15	4.14-4.14	5.6	8.97	0.03
O	10.33		9.57	15.38	32.78

Il est vraisemblable que la chlorophyllane de Hoppe-Seyler (qui n'est pas regardée comme une espèce) était une chlorophylle moins pure que celles de M. A. Gautier, car je ne pense pas qu'il y ait des chlorophylles aussi riches en azote.

La feuille vivante a toujours le même spectre. De plus j'ai observé que la solution alcoolique verte *recemment* faite, contenant non séparés tous les éléments solubles du grain vivant, avait comme ce dernier un spectre toujours le même. Mais souvent cela ne dure que peu de temps, et dans la solution neutre on voit des variations se produire. La mâche ordinaire (*valerianella olitoria*) montre très nettement cette action du temps amenant une sorte de mort moléculaire et l'apparition spontanée dans le violet d'une forte bande noire qui n'existait pas une heure avant. Dans ces conditions personne ne peut avoir la matière verte des feuilles *in actu*. Seules les diverses chloro-

phylles mortes qu'on peut séparer de la plante coupée ont été extraites en bloc par les chimistes. Presque tous ont poursuivi le but d'isoler « la chlorophylle », et par suite n'ont pas tenté de fractionner les différentes matières vertes possibles. D'ailleurs les masses d'extrait étaient trop faibles. Il faut au moins dix kilogrammes de feuilles sèches, soit cent kilos de plante fraîche, pour entreprendre un travail utile.

Les chlorophylles mortes sont loin de perdre toute importance. N'est-ce pas par l'étude du cadavre qu'on arrive à connaître l'anatomie du vivant? Si par les dissolvants, aussi neutres que possible, on isole diverses chlorophylles bien caractérisées, on est en droit de conclure que le corpuscule vivant les contenait. Liées peut-être entre elles et tenues en équilibre dans le but d'absorber la lumière selon un certain spectre discontinu, elles n'en étaient pas moins des pièces distinctes que le faible effort chimique de la mort et du temps ont séparées. Dans cet ensemble, chacune des chlorophylles travaille au temps de la vie avec ses fonctions propres, se formant et se dédoublant continuellement. Malgré le spectre unique d'un organe vivant, il peut donc exister une infinité de chlorophylles. Le spectre des feuilles est caractérisée par une forte bande $\lambda = 687 - 650$; une seconde $\lambda = 628 - 606$; une troisième $\lambda = 589 - 568$; une quatrième $\lambda = 548 - 537$. On commence à apercevoir la lumière dans le rouge $\lambda = 730$, et le spectre se termine dans le violet vers $\lambda = 525$. Les trois premières bandes sont d'intensité décroissant rapidement: elles donnent l'impression d'objets à contours indécis vus en perspective et dont la netteté s'efface de plus en plus avec l'éloignement. La quatrième est un peu plus intense que la troisième. Ces bandes se retrouvent, surtout la première et la seconde qui sont les plus fortes, dans tous les spectres chlorophylliens et leur donnent une assez grande similitude.

Quelle peut être la raison de la diversité des molécules vertes contenues dans les végétaux. Comme nous l'avons déjà vu il s'agit pour la plante de faire les synthèses prescrites pour son hérédité. Chaque molécule chlorophyllienne partielle a son mode de selection des radiations. Les bandes, sortes de tourbillons optochimiques, mettent en contact l'énergie avec la matière. Par ces bandes et les propriétés découlant de leur structure chimique, les chlorophylles construisent des molécules

spéciales, les abandonnent par une sorte de desquamation, les versent dans le milieu cellulaire et, comme dans tout acte de vie, recommencent leur cycle.

Une chlorophylle unique ne semble pas pouvoir faire à la fois des huiles et des sucres. Prises en masse, les chlorophylles sont de nature grasse et insoluble à première vue, et ainsi la fixation du carbone sous l'influence de la lumière semble bien se faire, pour une très large part, non dans l'eau, mais dans un milieu gras. L'expérience m'a montré que les chlorophylles diverses sont très réductrices : leur émulsion potassique réduit avec formation de miroir le nitrate d'argent ammoniacal. Leur composition prouve un grand déficit d'hydrogène et par suite des *lacunes*, capables de fixer les principes de l'air.

Il est un fait dont on n'a pu encore tenir compte dans les hypothèses relatives à la synthèse végétale, et qui y joue assurément un grand rôle, c'est la présence du carottène, répandu à profusion dans le monde végétal, comme l'a montré M. Arnaud. La croissance des plantes est liée selon cet auteur à la quantité de carottène. Ce carottène, très désaturé, possède la propriété curieuse pour un hydrocarbure d'être très coloré, et de donner des bandes d'absorption. C'est là une véritable chlorophylle jaune, et c'est ce corps qu'on a appelé xanthophylle.

Je n'ai pas la pensée d'expliquer par ces considérations des faits dont la technique réserve à la chimie biologique un travail sans fin. En fait, cherchons un exemple rapide de diversité chlorophyllienne dans le cas des fougères communes du commerce (*Aspidium filix fœmina*).

Cette plante, par une méthode de séparation que j'ai décrite (*Compt. Rend.*, t. CXIV, p. 1116, 1892) donne successivement :

1° Un alcool blanc $C^{16}H^{32}O$;

2° Du carottène ;

3° Aspidiophylle 1 — $C^{208}H^{347}O^{32}Az$. Première chlorophylle à bandes se rapprochant de la composition des acides gras ;

4° Aspidiophylle 2 — $C^{240}H^{320}O^{31}Az^5$. Belle matière colorante cireuse à reflets bleus colorant les dissolvants au 1/1000000^e.

5° Aspidiophylle 3 — $C^{21}H^{346}O^{48}Az^{20}$.

Je mentionne non les formules rationnelles, mais les formules brutes qui permettent un commentaire.

La chlorophylle I a une composition se rapprochant de celle des acides gras incomplets. L'oxygène et le carbone s'y trouvent dans le rapport de 2 à 13, l'azote étant peu abondant.

L'élément hydrocarbure domine dans la formule. Aussi cette chlorophylle, insoluble dans l'eau, se dissout dans le sulfure de carbone et le pentane en toutes proportions. Pyrogénée, elle donne en abondance une huile non saturée formant un savon. Le sulfure de carbone n'enlève que cette chlorophylle aux feuilles sèches.

La chlorophylle II n'est pas enlevée aux feuilles par le sulfure de carbone qui les laisse colorées ; il faut employer l'alcool. Cette matière est déjà moins une graisse, l'élément hydrocarbure y est moins influent. L'oxygène et le carbone sont ici dans le rapport de 2 à 15, mais l'azote intervient dans une proportion 5 fois plus grande. La pyrogénéation *ne rend plus, à beaucoup près*, autant d'acides gras ; une partie de l'oxygène est liée au carbone comme dans les sucres. Cette chlorophylle tend déjà vers les sucres et vers les albumines, vers les états solubles dans l'eau par lesquels les fragments chlorophylliens se déversent dans le protoplasma ou peuvent être digérés par lui.

La chlorophylle III ne possède plus de notable partie hydrocarbure. L'oxygène et le carbone sont comme 2 : 9, sans compter une forte proportion d'azote. Elle n'est pas encore soluble dans l'eau mais s'émulsionne avec les liquides un peu alcalins. L'azote dans ces formules a varié comme suit : 1, 5, 20. On voit donc qu'il y a des chlorophylles diverses, et de diverses fonctions dans une même plante.

ERRATUM. — Dans l'article de M. Bordet, p. 277, lire : « agglutine trois ou quatre parties de sang de *poule* », au lieu de « trois ou quatre parties de sang de *pigeon* ».

Le Gérant : G. MASSON.

Séeaux. — Imprimerie E. Charaire.